

Aus dem Institut für Nutztierwissenschaften und Technologie der  
Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Rostock

**Methodische Untersuchungen zur Beurteilung der  
proteolytischen Aktivität, der Proteolyse und der  
Desmolyse bei der Silierung eiweißreicher  
Grünfütterleguminosen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor Agriculturae  
der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Rostock

vorgelegt von

**Dipl.-Ing. agr. Anja Kofahl**  
geboren in Erlangen

Rostock, im August 2008

urn:nbn:de:gbv:28-diss2009-0063-6

Gutachter: Prof. Dr. Annette Zeyner (Universität Rostock)  
Prof. Dr. Martin Gabel (Universität Rostock)  
Prof. Dr. Karl-Heinz Südekum (Universität Bonn)  
Prof. Dr. Hans Schenkel (Universität Hohenheim)

Tag der Verteidigung: 03.04.2009

## **Opus 2**

**Meiner Familie und meinen Tieren gewidmet!**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht .....</b>	<b>3</b>
2.1	Rohproteinfraktionen in Futtermitteln.....	3
2.2	Veränderungen verschiedener Rohproteinfraktionen.....	5
2.2.1	Proteinabbau im Verdauungstrakt der Nutztiere .....	6
2.2.2	Proteinabbau während der Silierung .....	8
2.3	Beeinflussung des Proteinabbaus im Silierprozess .....	18
2.3.1	Externe Faktoren .....	18
2.3.2	Interne Faktoren .....	22
2.4	Enzymaktivitätsbestimmungen.....	25
<b>3</b>	<b>Aufgaben- und Zielstellung .....</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>Experimentelle Untersuchungen zur proteolytischen Aktivität und zum Proteinabbau während der Konservierung eiweißreicher Grünfütterleguminosen.....</b>	<b>30</b>
4.1	Material und Methoden .....	30
4.1.1	Auswahl und Aufbereitung des Pflanzenmaterials .....	30
4.1.2	Chemisch-analytische Methoden .....	33
4.1.3	Modifikation des Rostocker Fermentationstests nach PIEPER <i>et al.</i> (1989) und ZIERENBERG (2000) .....	36
4.1.4	Festlegung der Bewertungskriterien für den Proteinabbau und die proteolytische Aktivität .....	37
4.1.5	Statistische Auswertung .....	39
4.2	Ergebnisse .....	40
4.2.1	Konzeption einer in-vitro Methode zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität.....	40
4.2.1.1	Auswahl des Messkriteriums.....	40
4.2.1.2	Wahl des Testproteinpräparates .....	41
4.2.1.3	Bestimmung der Eigenproteolyse des Presssaftes und der Testproteinlösung, der Gesamtproteolyse und der proteolytischen Aktivität (Testschema).....	44
4.2.1.4	Presssaft als Substrat zur Quantifizierung des Proteinabbaus und der proteolytischen Aktivität in Grünfütterleguminosen und deren Silagen.....	46
4.2.1.4.1	Mengenanteile und TS-Gehalte .....	46

4.2.1.4.2	Stickstofffraktionen im Presssaft und im Presskuchen .....	50
4.2.1.5	Definition und Festsetzung der Bezugseinheit für die Angabe der proteolytischen Aktivität in Presssäften .....	55
4.2.1.6	Schlussfolgerungen .....	57
4.2.2	Quantifizierung von potentiellen Einflussfaktoren auf den Proteinabbau und die proteolytische Aktivität unter in-vitro Bedingungen.....	58
4.2.2.1	Einfluss externer Faktoren auf den Proteinabbau während der Fermentation .....	58
4.2.2.1.1	Einfluss des pH-Wertes .....	59
4.2.2.1.2	Einfluss der Osmolalität .....	60
4.2.2.1.3	Einfluss von Kombinationen aus erniedrigten pH-Werten in Verbindung mit einer erhöhten Osmolalität .....	61
4.2.2.1.4	Einfluss der Temperatur .....	62
4.2.2.1.5	Einfluss von Kombinationen aus pH-Wert, Osmolalität und Temperatur .....	63
4.2.2.1.6	Einfluss von Silierzusätzen.....	64
4.2.2.2	Einfluss interner Faktoren auf die proteolytische Aktivität .....	67
4.2.2.2.1	Einfluss des Vegetationsstadiums .....	67
4.2.2.2.2	Einfluss des Aufwuchses .....	68
4.2.2.2.3	Einfluss der Sorte .....	70
4.2.2.3	Schlussfolgerungen .....	70
4.2.3	Proteinabbau in Modellsilagen .....	72
4.2.3.1	Proteolyse, Desmolyse und proteolytische Aktivität während des Anwelkens ....	73
4.2.3.2	Proteolyse und Desmolyse während der Fermentation in Modellsilagen .....	76
4.2.3.2.1	Modellsilagen aus Luzerne.....	76
4.2.3.2.2	Modellsilagen aus Klee gras.....	89
4.2.3.3	Einfluss des pH-Wertes und der Osmolalität auf die proteolytische Aktivität .....	91
4.2.3.4	Einfluss sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe auf den Proteinabbau.....	93
4.2.3.5	Schlussfolgerungen .....	96
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>98</b>
5.1	Verwendbarkeit des Presssaftes als repräsentatives Medium zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität und zur Quantifizierung ausgewählter Stickstofffraktionen .....	98
5.2	Einschätzung des voraussichtlichen Proteinabbaus während der Silierung mittels im Presssaft analysierbarer Parameter und mit Hilfe des modifizierten Rostocker Fermentationstests .....	99

5.3	Beurteilung der Proteinqualität von Silagen mit ausgewählten Stickstofffraktionen im Presssaft.....	102
5.4	Aussagefähigkeit der Ergebnisse aus den in-vitro Untersuchungen und Validierung der Aussagen mit Hilfe der Stickstofffraktionen im Presssaft von Modellsilagen .....	104
5.5	Weiterer Forschungsbedarf durch die Ergebnisse der Bestimmung der proteolytischen Aktivität verschiedener Rotkleepresssäfte.....	117
<b>6</b>	<b>Schlussfolgerungen .....</b>	<b>120</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>124</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>127</b>

**Abbildungsverzeichnis**

**Tabellenverzeichnis**

**Anhang**

**Abkürzungsverzeichnis**

A1-3	Anwelkstufe 1-3 (unsiliertes Pflanzenmaterial)
ADF	Säure-Detergenzienfaser
Anwelk	Anwelkstufen der Modellsilagen
BSA	bovines Serumalbumin
CNCPS	Cornell Net Carbohydrate and Protein System
F	frisches Pflanzenmaterial (unsiliert)
FM	Frischmasse
k.A.	keine Angabe
KbE	Kolonie bildende Einheiten
kp/cm <sup>2</sup>	Kilopond je Quadratzentimeter
MSB	Milchsäurebakterien
N	Stickstoff
	fr. AS-N                freier Aminosäurenstickstoff
	Gesamt-N              Gesamtstickstoff
	NH <sub>3</sub> -N                Ammoniakstickstoff
	NPN                   Nichtproteinstickstoff
	Reinprotein-N        Reinproteinstickstoff
NDF	Neutrale-Detergenzienfaser
OS	Originalsubstanz
PA	proteolytische Aktivität
PK	Pufferkapazität
PK <sub>u</sub>	Presskuchen
PPO	Polyphenoloxidasen
PS	Presssaft
RFT	Rostocker Fermentationstest
RDP	ruminal abbaubares Protein
RUP	ruminal unabbaubares Protein
RubisCO	Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase
R.P.M.	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
SA1-3	Anwelkstufe 1-3 (siliertes Pflanzenmaterial)
SF	frisches Pflanzenmaterial (siliert)
TCE	Trichloressigsäure
TPL	Testproteinlösung
TS	Trockensubstanz
TSPS	Trockensubstanz des Presssaftes
WLK	wasserlösliche Kohlenhydrate
2n	diploid
4n	tetraploid

## 1 Einleitung

Proteine nehmen in allen lebenden Organismen eine zentrale Stellung ein. Der Stoffwechsel, die Struktur und die Funktion jeder Zelle werden maßgeblich durch Proteine bestimmt (JAKUBE und JESCHKEIT, 1982). In vitalen Pflanzen laufen Proteinauf- und -abbau parallel nebeneinander ab (MÜNTZ, 1984), wobei die Menge des in einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt tatsächlich vorhandenen Proteins von der Rate des Proteinabbaus abhängt, dem sogenannten „turnover“. In höheren Pflanzen werden pro Tag ca. 5 – 25 % des Gesamtproteins umgesetzt (STRASBURGER *et al.*, 1991). In den Zellen alternder Pflanzen übersteigen als Zeichen der Seneszenz die Abbauraten die Syntheseraten (LIBBERT, 1993).

Auch bei der Silierung, der bedeutendsten Methode zur Konservierung von Grünfuttermitteln, laufen eine Vielzahl von enzymatisch gesteuerten Umsetzungen ab. Neben erwünschten Prozessen, bei denen aus vorhandenen, zum Teil enzymatisch gebildeten oder zugesetzten Gärsubstraten die zur Konservierung notwendige Milchsäure gebildet wird, sind vor allem Umsetzungen der Stickstoffverbindungen kritisch zu beurteilen. Sie beeinflussen den Gehalt an für Wiederkäuer nutzbarem Protein negativ (OWENS *et al.*, 1999b) und erleichtern den Prozess der Desmolyse, d.h. den Abbau der Aminosäuren zu Ammoniak. Auch für monogastrische Nutztiere, die in bestimmten Phasen (z.B. güste und niedertragende Sauen) mit Silagen sinnvoll gefüttert werden können, gehen durch den Proteinabbau während der Silierung wertvolle Aminosäuren verloren.

Zu Beginn der Silierung, d.h. nach dem Schnitt des zu silierenden Gutes, überwiegen katabole Prozesse. Im Grünfutter liegen 75 bis 90 % des Gesamtstickstoffs als Reinproteinstickstoff vor (OHSHIMA und MCDONALD, 1978), in Silagen liegt der Anteil nur bei 20 bis 50 % (VOSS, 1967). Der Anteil des Nichtproteinstickstoffs steigt demzufolge im Zuge der Silierung stark an. Wenn es gelingt, den Proteinabbau während der Silierung einzuschränken, sind Silagen aus eiweißreichen Grünfutterleguminosen für die Eiweißversorgung der Wiederkäuer sowie der Nichtwiederkäuer interessant. Die Beeinflussung dieser enzymatisch gesteuerten Prozesse bei der Silierung durch externe Faktoren wie z.B. Temperatur (MUCK und DICKERSON, 1988), TS-Gehalt des zu silierenden Grüngutes (MCKERSIE, 1985) und pH-Wert (CARPINTERO *et al.*, 1979) ist im Allgemeinen bekannt. Die quantitativen Wirkungen dieser Faktoren und die dabei auftretenden Wechselwirkungen auf das Ausmaß des Proteinabbaus sind weniger untersucht. Es bestehen weiterhin pflanzenabhängige Unterschiede bei der Höhe des Proteinabbaus während der Silierung (ALBRECHT und MUCK, 1991; JONES *et al.*, 1995a). Daher ist für die Gestaltung des Silierverlaufes im



Vorfeld die Kenntnis über die proteolytische Aktivität und die Abbauanfälligkeit des Pflanzenproteins wichtig.

Die vorliegenden Untersuchungen sollen den Kenntnisstand hinsichtlich des Proteinabbaus und seiner Beeinflussbarkeit während der Silierung, d.h. ab dem Schnitt, erweitern. Darüber hinaus sollen für die Silierpraxis geeignete Untersuchungsmethoden konzipiert werden, um einen Beitrag zur Herstellung hochwertiger Silagen aus einheimischen Grünfütterleguminosen zu leisten.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Rohproteinfraktionen in Futtermitteln

Das pflanzliche Rohprotein in Futtermitteln ist die Summe aller Verbindungen, die Stickstoff enthalten. Das Rohprotein enthält die Fraktion der „echten“ Proteine, das Reinprotein, und verschiedene Nichtproteinstickstoff-Verbindungen (NRC, 2001). Das Reinprotein besteht aus einer für jedes Protein charakteristischen Sequenz von Aminosäuren (LYTTLETON, 1973), die über Peptidbindungen miteinander verbunden sind (DOSE, 1996). Diese Peptidketten sind in einer für das jeweilige Protein spezifischen dreidimensionalen Struktur angeordnet (LYTTLETON, 1973; DRESSLER und POTTER, 1992). Je nach ihren Löslichkeitseigenschaften werden die Pflanzenproteine in Albumine, Globuline, Gluteline und Prolamine eingeteilt (OSBORNE, 1924; VAN SOEST, 1994). Die Proteine werden weiterhin nach ihrem Vorkommen in Samen- und Blattproteine unterteilt, wobei die Proteine in den Samen als Speicherproteine fungieren. Die Proteine in den Blättern der Pflanzen sind im Gegensatz zu den Speicherproteinen aktiv am Proteinumsatz der Pflanzen beteiligt (LYTTLETON, 1973). Die Nichtproteinstickstoff-Verbindungen sind Peptide, freie Aminosäuren, Nukleinsäuren, Amide, Amine und Ammoniak (NRC, 2001), die genau wie die löslichen Proteine im Pansen abgebaut werden (BLETHEN *et al.*, 1990). Dies wurde aus Untersuchungen mit einer simulierten Pansenflüssigkeit abgeleitet. Die Ergebnisse zeigten, dass die erhaltenen Löslichkeitswerte eng mit den Werten korreliert waren, die durch Lösung in Wasser und in Salzlösung erhalten wurden.

Ein System, das die Rohproteinfraktionen der Futtermittel sowohl nach deren Löslichkeitseigenschaften als auch nach ihrer ruminalen Abbaubarkeit einteilt, ist das Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS) (SNIFFEN *et al.*, 1992; VAN SOEST, 1994). Danach wird das Futterrohprotein in fünf Fraktionen unterteilt (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Bestimmung der Rohproteinfraktionen mit verschiedenen Lösungsmitteln nach dem Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS) (SNIFFEN *et al.*, 1992; NRC, 2001)

Lösungsmittel	Löslichkeit der Proteinfraktionen nach dem CNCPS				
	A	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	C
Boratpuffer	+	+	-	-	-
	TCE* löslich	fällbar mit TCE			
neutrale Detergenzienlösung	+	+	+	-	-
saure Detergenzienlösung	+	+	+	+	-
Verhalten im Pansen	sofort abbaubar	schnell abbaubar	mittel abbaubar	langsam abbaubar	nicht abbaubar
Bestimmbarkeit	analytisch	analytisch	kalkuliert	kalkuliert	analytisch

\* Trichloressigsäure

In Fraktion A sind Nichtproteinstickstoff-Verbindungen (Ammoniak, Peptide, Aminosäuren) enthalten. In der in allen Lösungsmitteln unlöslichen Fraktion C sind ligninassoziierte Proteine, Tannin-Protein-Komplexe und denaturierte Proteine zusammengefasst. Die Fraktion C gilt auch als nicht im Dünndarm nutzbar (NRC, 2001). Die Fraktion B beinhaltet das potentiell abbaubare Reinprotein und ist in die drei Unterfraktionen B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> und B<sub>3</sub> unterteilt. Während die Fraktion B<sub>1</sub> analytisch bestimmbar ist (löslich in Boratpuffer und fällbar mit Trichloressigsäure), werden die Fraktionen B<sub>2</sub> und B<sub>3</sub> rechnerisch ermittelt. Fraktion B<sub>3</sub> wird als Differenz von in neutraler Detergenzienlösung unlöslichem Protein (Fraktionen B<sub>3</sub> und C) minus Fraktion C ermittelt. Da dieses Protein zellwandgebunden ist, wird es im Pansen nur langsam abgebaut. Daher entgeht ein hoher Prozentsatz dieser Fraktion B<sub>3</sub> dem ruminalen Abbau (SNIFFEN *et al.*, 1992). Aus der Differenz von in Boratpuffer unlöslichem Protein und in neutraler Detergenzienlösung unlöslichem Protein ergibt sich die Fraktion B<sub>2</sub>. Die Abbaugeschwindigkeit liegt zwischen der von Fraktion B<sub>1</sub> und Fraktion B<sub>3</sub>. In Abhängigkeit von der Passagerate wird so ein Teil nicht ruminal abgebaut (SNIFFEN *et al.*, 1992). Mit Hilfe der Abbau- und Passageraten kann sowohl das im Pansen abbaubare (RDP) als auch das im Pansen unabbaubare Protein (RUP) errechnet werden (NRC, 2001). SHANNAK *et al.* (1999) untersuchten die Abweichung von mit dem CNCPS geschätzten und in-sacco ermittelten RUP-Gehalten und erhielten gute Übereinstimmungen.

Für den Nichtwiederkäuer ist der Gehalt der einzelnen Aminosäuren wesentlich, der sich aus den Anteilen im Reinprotein und den freien Aminosäuren ergibt. Daher bestimmt die Aminosäurezusammensetzung des Futters die Qualität des Futterproteins für den Nichtwiederkäuer (MÜLLER, 1996).

## 2.2 Veränderungen verschiedener Rohproteinfraktionen

Der Stickstoffmetabolismus ist für alle Organismen die Grundlage des Lebens. Einen kleinen Teil zu diesem hochkomplexen Stoffwechselvorgang trägt der Proteinabbau bei. Die dabei entstehenden Stickstoffverbindungen werden entweder zur Synthese neuer Proteine genutzt oder dienen als Energiequelle (SCHWAB *et al.*, 2005).

Der Proteinabbau, der zu einer Veränderung der Zusammensetzung der Rohproteinfraktionen führt, wird in zwei Stufen untergliedert. Zunächst werden die Peptidbindungen hydrolytisch gespalten. Dieser Prozess, die sogenannte **Proteolyse**, erfolgt durch proteolytische Enzyme, die in vier Hauptklassen eingeteilt werden. Hinsichtlich ihres pH-Wert- und Temperaturoptimums und der Substratspezifität werden sie klassifiziert als (MCKERSIE, 1981; HUFFAKER, 1990):

- |                         |   |                |
|-------------------------|---|----------------|
| • saure Proteinasen,    | } | Endopeptidasen |
| • neutrale Proteinasen, |   |                |
| • Carboxypeptidasen und | } | Exopeptidasen  |
| • Aminopeptidasen.      |   |                |

Während die Endopeptidasen Peptidbindungen im Inneren der Aminosäurekette spalten, greifen die Exopeptidasen von den Enden der Ketten her an (MÜNTZ, 1984). Die Exopeptidasen werden in die Carboxypeptidasen, die am Carboxylende angreifen, und die Aminopeptidasen, die am Aminoende ansetzen, unterteilt (HUFFAKER, 1990). Einen Spezialfall bilden die Dipeptidasen, die nur Dipeptide in ihre beiden Aminosäuren spalten. Durch die Einwirkung der Endopeptidasen entstehen Makro-, Poly-, Oligo-, Tri- und Dipeptide (MÜNTZ, 1984), die durch die Exopeptidasen bis zu den Aminosäuren hydrolysiert werden. Im sich daran anschließenden Prozess erfolgt der Abbau der Aminosäuren. Die sogenannte **Desmolyse** wird in drei mögliche Abbauvorgänge untergliedert (SEYFARTH *et al.*, 1989a; MCDONALD *et al.*, 1991):

- Decarboxylierung: als Produkte Amine und CO<sub>2</sub>,
- Desaminierung: als Produkte  $\alpha$ -Ketosäuren, Fettsäuren, Alkohole, Aldehyde und NH<sub>3</sub>,
- Oxidation/Reduktion (STICKLAND-Mechanismus): als Produkte Fettsäuren/Carbonylverbindungen, NH<sub>3</sub> und CO<sub>2</sub>.

Der sowohl im Verdauungstrakt der Nutztiere als auch bei der Silierung ablaufende Proteinabbau erfolgt durch Enzyme unterschiedlicher Herkunft. Zum einen stammen diese von dem Organismus (Tier, Pflanze) selbst, zum anderen werden sie von Mikroorganismen gebildet. Im Fall der Verfütterung von z.B. Silage an Nutztiere kommen demnach drei

Enzymquellen in Betracht, die für den Proteinabbau verantwortlich sind. Dies sind die tiereigenen Enzyme, die Enzyme der Mikroorganismen des Verdauungstraktes und die des Futters. Eine Differenzierung der Enzymwirkungen nach ihrer Quelle ist dabei nicht einfach. Viele Untersuchungen mit zum Teil differierenden Ergebnissen wurden bisher unternommen, um eine Aufteilung der proteolytischen und desmolytischen Aktivitäten nach ihrer Herkunft vorzunehmen (z.B. am Tier: Nichtwiederkäuer: GENELL *et al.*, 1976; LOW, 1982; MASON *et al.*, 1982; RATCLIFFE und LOW, 1984; Wiederkäuer: THEODOROU *et al.*, 1996; ZHU *et al.*, 1999; LÖSCHE *et al.*, 2008; z.B. in Silagen HERON *et al.*, 1986; MERRY *et al.*, 1995; WINTERS *et al.*, 2000).

### 2.2.1 Proteinabbau im Verdauungstrakt der Nutztiere

Der Proteinstoffwechsel der Wiederkäuer beginnt bereits im Pansen und ist daher weitaus komplexer als bei den Nichtwiederkäuern (WALKER *et al.*, 2005). Während das NRC (2001) den Proteinabbau ausschließlich auf die proteolytisch wirkenden Pansenmikroben zurückführt, gehen neuere Untersuchungen von einer Beteiligung pflanzlicher Proteasen an der im Pansen stattfindenden Proteolyse aus (KINGSTON-SMITH *et al.*, 2005; WALKER *et al.*, 2005). Die Wirkung der Enzyme pflanzlichen Ursprungs spielt dabei jedoch nur eine untergeordnete Rolle. Hauptsächlich sind die auch zahlenmäßig am häufigsten im Pansenmilieu vorkommenden Bakterien für den Proteinabbau im Pansen verantwortlich (BROCK *et al.*, 1982; MCALLISTER *et al.*, 1994; SCHWAB *et al.*, 2005).

Das im Pansen umgesetzte Rohprotein setzt sich aus dem Futterprotein, dem mikrobiellen Protein und dem endogenen Stickstoff aus Speichel und abgestorbenen Epithelzellen zusammen (SCHWAB *et al.*, 2005). Das RDP und alle weiteren im Pansen abbaubaren Proteine werden über Oligopeptide und Peptide bis hin zu den Aminosäuren hydrolysiert (WALKER *et al.*, 2005). Die Aminosäuren und die weiteren Nichtproteinstickstoff-Verbindungen (NPN) des RDP werden zu Ammoniak umgesetzt, dem für die Mikrobenproteinsynthese im Pansen eine zentrale Bedeutung über den ruminohepatischen Kreislauf zukommt (SCHWAB *et al.*, 2005). Die Entstehung von zuviel Ammoniak führt allerdings zu Leistungsdepressionen, zu einer übermäßigen Beanspruchung der Leber und belastet die Umwelt durch erhöhte Stickstoffausscheidung (RUSSELL *et al.*, 1992; KINGSTON-SMITH und THEODOROU, 2000; WALKER *et al.*, 2005). Die aus dem Pansen fließenden Stickstoffverbindungen (RUP, Mikrobenprotein, endogener Stickstoff) gelangen

über den Blätter- und Labmagen (homolog zum monogastrischen Magen) in den Dünndarm. Dort werden sie enzymatisch verdaut, entsprechend der Verdauungsvorgänge und der Absorption der Proteine im monogastrischen Verdauungssystem über eine hydrolytische Spaltung der Peptidbindungen durch Proteasen. Die beteiligten Endopeptidasen, die auch Proteinasen genannt werden, sind Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin und Elastase (JEROCH *et al.*, 1999). Die aus diesen hydrolytischen Vorgängen entstehenden Aminosäuren und kleine Peptide (Tri- und Dipeptide) werden durch die Darmwand aufgenommen (BREVES und WOLFFRAM, 2006) und gelangen zum größten Teil über die Pfortader zur Leber (ECKERT, 1993). Ein geringer Teil der absorbierten Aminosäuren wird über das Lymphsystem transportiert (KIRCHGESSNER, 2004). Die Aminosäuren gelangen in den sogenannten Aminosäure-Pool und werden im intermediären Stoffwechsel zu körpereigenen Proteinen synthetisiert, in andere Verbindungen umgebaut oder für die Energiegewinnung abgebaut. Die im Dünndarm verbleibenden Aminosäuren werden von der Intestinalflora katabolisiert und zum Aufbau von Mikrobenprotein eingesetzt (LOW und ZEBROWSKA, 1989).

Das Verdauungssystem der Wiederkäuer beinhaltet sowohl Vor- als auch Nachteile. Zum einen können Inhaltsstoffe, wie z.B. anorganische Stickstoffverbindungen, die andere Nutztiere nicht verwerten können, genutzt werden. Zum anderen sind Wiederkäuer hinsichtlich der Stickstoffretention sehr ineffektiv (WALKER *et al.*, 2005). Bei typischer Rationsgestaltung gehen etwa 70 % des täglich aufgenommenen Stickstoffs durch Harn und Kot verloren (CASTILLO *et al.*, 2001) und belasten die Umwelt. Rationen für Wiederkäuer müssen sowohl auf die Pansenmikroorganismen als auch auf deren Wirtstier, den Wiederkäuer, abgestimmt sein (HRISTOV und JOUANY, 2005). Das Verhältnis zwischen RDP und RUP muss ausbalanciert sein, so dass es den Ansprüchen der Mikroorganismen im Pansen und den Ansprüchen des Wirtstieres an essentiellen Aminosäuren gerecht wird (SCHWAB *et al.*, 2005). CASTILLO *et al.* (2001) konnten durch Futterrationen mit einem geringen RDP-Anteil die Stickstoffausscheidung minimieren. Bei der Rationsgestaltung muss darauf geachtet werden, dass die nötige Energie zur Synthese des Mikrobenproteins zur Verfügung steht. Die Anforderungen an eine synchrone Rationsgestaltung sind in vielen Arbeiten beschrieben (z.B. BLANK *et al.*, 1998; KIM *et al.*, 1999; DEWHURST *et al.*, 2000; TAMMINGA und SÜDEKUM, 2000; SCHMIDT, 2003).

### 2.2.2 Proteinabbau während der Silierung

Proteinauf- und -abbau („protein turnover“) laufen in vitalen Pflanzen parallel nebeneinander ab (MÜNTZ, 1984), wobei in wachsenden Pflanzen die Syntheseraten höher liegen als die Abbauraten. In Folge von Seneszenz, z.B. eingeleitet durch umweltbedingten Wasserstress beim Schnitt der Pflanzen, überwiegt der Abbau des Proteins (FINLEY *et al.*, 1980; HUFFAKER, 1990; MÜNTZ *et al.*, 2002; COUPE *et al.*, 2003).

Bezüglich des Proteinabbaus während der Silierung werden zwei Phasen unterschieden (MCDONALD *et al.*, 1991):

- Phase 1: In der Anwelkphase werden als Hauptprodukte des Proteinabbaus Peptide, Aminosäuren und Amide gebildet.
- Phase 2: In der sich anschließenden Fermentationsphase entstehen neben freien Aminosäuren auch Ammoniak und biogene Amine.

Sofort nach dem Schnitt beginnt demnach die **Proteolyse**, wobei die Peptidbindungen hydrolytisch gespalten werden. Für die Umsetzungen während dieses Prozesses sind vor allem Pflanzenenzyme verantwortlich (KEMBLE, 1956; OHSHIMA und MCDONALD, 1978; SEYFARTH *et al.*, 1989a). Die Pflanzenenzyme, die sich in vitalen Pflanzen vor allem in den Vakuolen der Zellen befinden (CALLIS, 1995; CAVALLARIN *et al.*, 2005), werden durch die während des Anwelkens stattfindenden Seneszenzprozesse in das Zytoplasma abgegeben (BROUQUISSE *et al.*, 2001) und sind noch lange nach dem Tod der Pflanzenzellen extrazellulär wirksam (GOUET und FATIANOFF, 1964; BECK, 1966; MCKERSIE, 1981). Die Wirkung der Enzyme im Prozess der Proteolyse setzt das Vorhandensein von Wasser voraus (SLOTTNER und BERTILSSON, 2006), weshalb die proteolytischen Prozesse überwiegend in der wässrigen Phase der Pflanzen und Silagen erfolgen. Die wichtigsten proteolytischen Enzyme sind löslich bzw. suspendierbar in Wasser (HELDT, 1999). Für den Prozess der **Desmolyse**, der sich insbesondere zu Fermentationsbeginn an die Proteolyse anschließt, sind vor allem mikrobielle Enzyme verantwortlich (MCDONALD *et al.*, 1991). In Versuchen unter anderem auch mit  $\gamma$ -Strahlen behandeltem Pflanzenmaterial zeigte sich, dass Pflanzenenzyme, deren Aktivität durch die Bestrahlung nicht beeinflusst wurde, nur eingeschränkte desmolytische Fähigkeiten besitzen (HERON *et al.*, 1986; SEYFARTH *et al.*, 1989a; WINTERS *et al.*, 2000).

Die wichtigsten proteolytisch bzw. desmolytisch wirksamen Mikroben sind Clostridien und Enterobakterien (OHSHIMA und MCDONALD, 1978), wobei auch angenommen wird, dass Milchsäurebakterien (MSB) unter bestimmten Umständen proteolytische oder desmolytische

Aktivitäten aufweisen (MCDONALD *et al.*, 1991). Das Auftreten beider Enzymquellen sieht PAHLOW (1978) in einer Sukzession der Wirkung pflanzlicher Proteasen durch mikrobielle Enzyme in Folge der Gärsäurenbildung. Bei Fermentationsbeginn im Silo werden bakterielle Enzyme aktiviert oder durch die sich stark vermehrende Silageflora neu gebildet (SEYFARTH *et al.*, 1989a).

Als Folge dieser Prozesse steigt der NPN-Anteil am Gesamtstickstoff (Gesamt-N) während der Silierung stark an. Im Grünfutter liegen 75 bis 90 % des Gesamt-N als Reinproteinstickstoff (Reinprotein-N) vor (OHSHIMA und MCDONALD, 1978), wovon während des Anwelkens bereits bis zu 20 % zu NPN hydrolysiert werden (KEMBLE und MACPHERSON, 1954). Während der zwei Phasen der Silierung steigt der Anteil des NPN auf 50 bis 80 % an (VOSS, 1967). Abbildung 2.1 zeigt die Veränderung der Zusammensetzung des Gesamt-N während der Silierung.

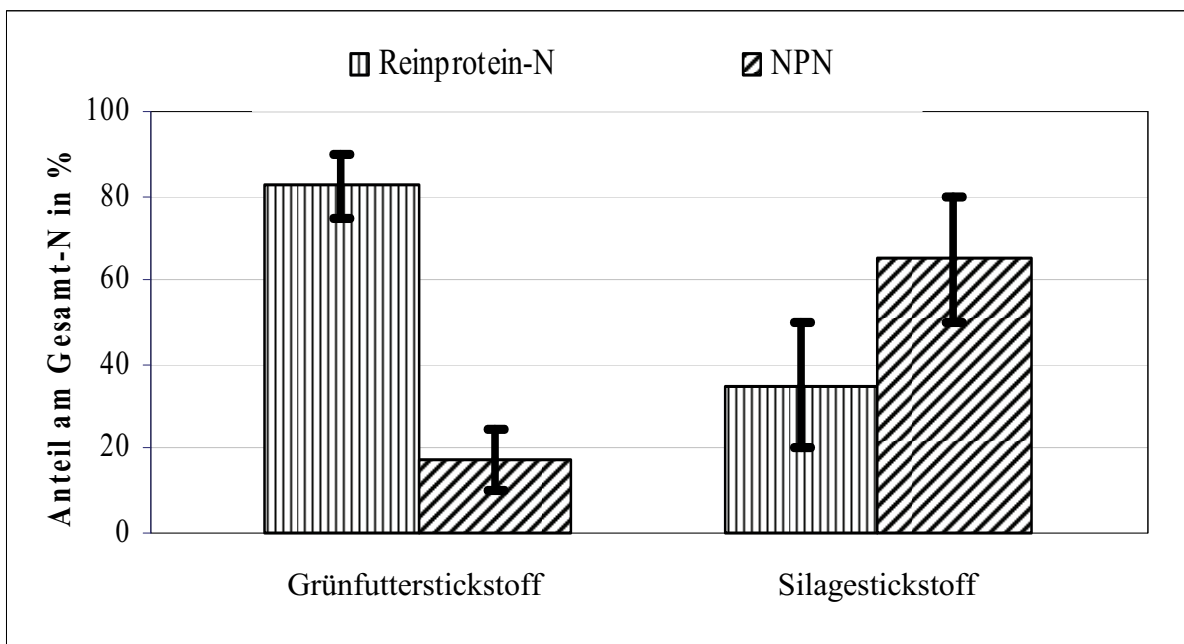


Abbildung 2.1: Zusammensetzung des Gesamtstickstoffs (Gesamt-N) aus Reinproteinstickstoff (Reinprotein-N) und Nichtproteinstickstoff (NPN) von Grünfutter und Silage (nach REUTER, 1982)

Vom Schnitt bis zum Ende des Silierprozesses werden somit 25 bis 70 % des Reinproteins abgebaut. HATFIELD und MUCK (1999) gehen von einer 44 bis 87 %igen Überführung des cytoplasmatischen Pflanzenproteins in kleine Peptide, Aminosäuren und Ammoniak aus. Durch diese Verschiebung der Zusammensetzung der N-Fractionen hin zu den hochlöslichen Proteinbruchstücken ist das Silagerohprotein sehr schnell verfügbar für die Pansenmikroben



(GIVENS und RULQUIN, 2004). Der Ammoniakgehalt der Pansenflüssigkeit nach der Verfütterung von Silage ist im Vergleich zu dem Gehalt nach Heufütterung signifikant höher. Allerdings ist die Effizienz der mikrobiellen Stickstoffsynthese wegen dieses rapiden und meist nicht mit dem Freiwerden von Kohlenhydraten synchronen Anfalls von Stickstoff niedriger (SIDDON *et al.*, 1985). Folglich führt eine Senkung der Löslichkeit des Futterrohproteins zu einer Leistungssteigerung der Tiere (MAJDOUB *et al.*, 1978; ZOOK, 1982). Durch die Reduzierung des Proteinabbaus während der Silierung kann demzufolge der Anteil der potentiell im Pansen nicht abbaubaren Stickstoffverbindungen erhöht werden, der für das Tier selbst verfügbar ist (MARSHALL *et al.*, 1993). Verbesserungen der Tierleistungen, die durch das Verfüttern von Silagen mit einem verminderten Proteinabbau herbeigeführt wurden, sind damit erklärbar (WINTERS *et al.*, 2000).

#### *Veränderungen während des Anwelkens*

Tabelle 2.2 zeigt Untersuchungen verschiedener Autoren mit Grünfütterleguminosen zum Verhalten von Stickstofffraktionen während des Anwelkens. Zum besseren Verständnis der Tabellenauswertung wurde hinter dem Zitat die jeweils in der Tabelle verwendete Zahl als Quellenangabe angegeben.

Tabelle 2.2: Veränderungen ausgewählter Stickstofffraktionen (Gesamtstickstoff: Gesamt-N, Nichtproteinstickstoff: NPN, Ammoniakstickstoff:  $\text{NH}_3\text{-N}$ , freier Aminosäurenstickstoff: fr. AS-N) durch das Anwelken verschiedener Grünfütterleguminosen

Pflanzen- material	Stadium	Quel- le	Nach dem Schnitt				Nach dem Anwelken				An- wel- zeit		
			TS %	Gesamt-N % d. TS	NPN	NH <sub>3</sub> -N % des Gesamt-N	fr. AS-N %	Gesamt-N % d. TS	NPN	NH <sub>3</sub> -N % des Gesamt-N		fr. AS-N %	
Luzerne	vor Knospe	[1]	17,9	3,4	23,4	k.A.	k.A.	37,4	3,2	31,8	k.A.	k.A.	k.A.
	vor Blüte	[2]	14,0	4,3	19,9	k.A.	k.A.	32,1	4,0	24,3	k.A.	k.A.	24 h
	Beginn Blüte	[3]	24	k.A.	0,8***	k.A.	k.A.	35	k.A.	0,9***	k.A.	k.A.	12 h
	Beginn Blüte	[5]	17,1	3,5	19,9	0,4	3,7	35,0	3,4	28,1	0,7	6,3	k.A.
	Beginn Blüte	[8]	19	2,8	18,3	k.A.	k.A.	28	k.A.	19,5	k.A.	k.A.	6 h
	Beginn Blüte	[9]	28,8	3,2	22,6	k.A.	k.A.	58,1	2,9	28,4	k.A.	k.A.	24 h
	in Blüte	[6]	21,0	3,7	15,8	k.A.	k.A.	33,3	3,7	18,1	k.A.	k.A.	6 h
	k.A.	[7]	16,2	4,7	14,2	k.A.	k.A.	34,0	5,0	27,9	k.A.	k.A.	k.A.
	k.A.	[4]	k.A.	3,9	8,7	k.A.	k.A.	32	4,1	10,3	k.A.	k.A.	24 h
	in Blüte	[6]	13,9	3,5	14,2	k.A.	k.A.	32,8	3,4	15,7	k.A.	k.A.	9,5 h
	Beginn Blüte	[8]	21	3,1	8,2	k.A.	k.A.	55	k.A.	10,9	k.A.	k.A.	6 h
Kleegras	k.A.	[7]	15,5	3,5	12,9	k.A.	k.A.	34,8	3,5	18,6	k.A.	k.A.	k.A.
	k.A.	[10]	17,3	2,7	7,5	0,1	k.A.	46,2	2,9	16,8	0,2	k.A.	48 h
	k.A.	[10]	17,3	2,7	7,5	0,1	k.A.	19,9	3,0	24,8	0,3	k.A.	48 h*
Hornklee	Beginn Blüte	[8]	16	3,2	13,2	k.A.	k.A.	26	k.A.	13,0	k.A.	k.A.	6 h
Esparsette	Beginn Knospe	[11]	12,3	2,8	12,2	0,5	4,0**	32,2	3,0	34,9	3,7	11,5**	71 h
Kronwicke	k.A.	[4]	k.A.	4,3	15,6	k.A.	k.A.	29	4,3	16,7	k.A.	k.A.	24 h

\* Welken unter feuchten Bedingungen, \*\* in mol AS·kg<sup>-1</sup> Gesamt-N, \*\*\* % der TS

[1] CAVALLARIN *et al.*, 2000; [2] CHARMLEY und VEIRA, 1990; [3] MCKERSIE und BUCHANAN-SMITH, 1982; [4] MESSMAN *et al.*, 1994; [5] MUCK, 1987; [6] OWENS *et al.*, 1999a; [7] OWENS *et al.*, 1999b; [8] PAPADOPOULOS und MCKERSIE, 1983b; [9] SUTTON und VETTER, 1971; [10] CARPINTERO *et al.*, 1979; [11] CAVALLARIN *et al.*, 2005

Die Trockensubstanz-Gehalte der frischen Grünfütterleguminosen lagen zwischen 12,3 und 28,8 %, im Mittel wurden die Pflanzen mit 18,1 % Trockensubstanz (TS) geerntet, wobei (MESSMAN *et al.*, 1994) [4] keine Angaben zum TS-Gehalt der untersuchten Luzerne und Kronwicke zur Ernte gemacht haben. Die Luzerne wurde durchschnittlich mit 19,8 % TS beprobt, die zahlenmäßig geringeren Rotkleeproben waren im Mittel feuchter (16,8 % TS). Die Gesamt-N-Gehalte in der TS bewegten sich zwischen 2,7 % (Klee gras) und 4,7 % (Luzerne), im Mittel bei einem für Grünfütterleguminosen üblichen Gehalt von 3,5 % Gesamt-N in der TS (DLG, 1997). Das geschnittene Grünfütter wurde zum Teil unter Laborbedingungen, aber zum größten Teil auf dem Feld angewelkt. Die Dauer des Anwelkens reichte von 6 bis 71 Stunden, in drei der elf zitierten Arbeiten gibt es keine Angabe zu der Anwelkzeit. Durch das Anwelken stiegen die TS-Gehalte durchschnittlich auf 35,3 % an. Den höchsten Gehalt von 58,1 % wies die von SUTTON und VETTER (1971) [9] für 24 Stunden angewelkte Luzerne auf, die jedoch schon zur Ernte mit 28,8 % TS am trockensten im Vergleich zu den anderen frischen Grünfütterleguminosen war. Am feuchtesten blieb das von CARPINTERO *et al.* (1979) [10] unter schlechten Bedingungen für 48 Stunden angewelkte Klee gras mit 19,9 % TS. Während des Anwelkens veränderten sich die Gesamt-N-Gehalte der Grünfütterleguminosen, jedoch nicht gerichtet. Niedrigere Gesamt-N-Gehalte können auf Blattverluste, d.h. Verlust der N-haltigen Bestandteile zurückgeführt werden (MUCK, 1987) [5], während Trockenmasseverluste im allgemeinen Sinn höhere Gesamt-N-Gehalte begründen (OWENS *et al.*, 1999b) [7].

Als Kennzeichen des Proteinabbaus während des Anwelkens wird in den Arbeiten die Abnahme des Reinprotein-N bzw. der Anstieg des NPN gewertet. Sofern möglich erfolgt die Auswertung aller Arbeiten mit der Veränderung des NPN-Anteils am Gesamt-N.

Im Mittel **aller Pflanzenproben** stieg der Anteil des NPN am Gesamt-N während des Anwelkens von 14,6 auf 21,2 % des Gesamt-N an.

Die NPN-Anteile der frischen **Luzerne** lagen zwischen 8,7 und 23,4 % des Gesamt-N, durchschnittlich bei 17,9 % des Gesamt-N. Nach dem Anwelken stiegen die Anteile auf 10,3 bis 31,8 % NPN des Gesamt-N an, im Mittel auf 23,6 %. Werden diese NPN-Anteile am Gesamt-N auf die TS umgerechnet, so decken sie sich in der Höhe mit den von MCKERSIE und BUCHANAN-SMITH (1982) [3] gemachten Angaben von 0,8 % vor und 0,9 % NPN in der TS nach dem Anwelken von Luzerne.

Bei den drei frischen **Rotklee proben** bewegten sich die Anteile des NPN von 8,2 bis 14,2 % am Gesamt-N, im Mittel betrugen sie 11,8 %. Nach dem Anwelken waren durchschnittlich 15,7 % des Gesamt-N NPN.

Relativ stiegen die Anteile des NPN am Gesamt-N im Mittel **aller Pflanzenproben** um 45 % während des Anwelkens. Die Anteile von **Luzerne** und **Rotklee** stiegen während des Anwelkens um 32 bzw. 33 % an.

Diese Veränderungen sind kennzeichnend sowohl für die proteolytischen als auch für die desmolytischen Aktivitäten. Eine Separierung der Proteolyse von der Desmolyse erfolgt jedoch nur durch MUCK (1987) [5] und CAVALLARIN *et al.* (2005) [11], die sowohl in den frischen Pflanzen als auch im Anwelkgut freie Aminosäuren und Ammoniak bestimmt haben. Beide Stickstofffraktionen stiegen während des Anwelkens deutlich an. Aus diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass während des Anwelkens neben der Proteolyse auch die Desmolyse ablief. Aus der alleinigen Angabe des  $\text{NH}_3\text{-N}$ -Anteils am Gesamt-N vor und nach dem Anwelken von Klee gras durch CARPINTERO *et al.* (1979) [10] kann auch in Verbindung mit der Angabe des NPN-Anteils kein Rückschluss auf das Ausmaß der bis zu den Aminosäuren führenden Proteolyse während des Anwelkens getroffen werden.

#### *Veränderungen während der Fermentation im Silo*

Obwohl in der Praxis hauptsächlich Anwelksilagen hergestellt werden, sind die Veränderungen der Stickstofffraktionen während der Silierung von **frischen** Grünfütterleguminosen von Interesse (Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3: Veränderungen ausgewählter Stickstofffraktionen (Gesamtstickstoff: Gesamt-N, Nichtproteinstickstoff: NPN, Ammoniakstickstoff:  $\text{NH}_3\text{-N}$ , freier Aminosäurenstickstoff: fr. AS-N) während der Silierung frisch geschchnittener Grünfütterleguminosen

Pflanzen- material	Quel- le	Nach dem Schnitt				Nach dem Silieren				Silier- dauer			
		TS %	Gesamt-N % d. TS	NPN	NH <sub>3</sub> -N % des Gesamt-N	fr. AS-N	Silierzusatz	TS %	Gesamt-N		NPN	NH <sub>3</sub> -N % des Gesamt-N	fr. AS-N
Luzerne	[1]	17,9	3,4	23,4	k.A.	k.A.	ohne	17,1	3,6	71,6	47,4	k.A.	120 d
	[3]	24	k.A.	0,8***	k.A.	k.A.	ohne	k.A.	k.A.	2,1***	k.A.	k.A.	21 d
	[9]	28,8	3,2	22,6	k.A.	k.A.	ohne	28,1	3,5	62,0	k.A.	k.A.	k.A.
	[14]	k.A.	k.A.	α-Amino-N: 27 mg/g Sil.				k.A.	ohne	α-Amino-N: 136 mg/g Sil.			30 d
	[5]	17,1	3,5	19,9	0,4	3,7	Zucker	14,7	3,5	86,8	15,6	45,1	60 d
	[13]	13,3	4,1	14,5	0,7	4,7	MSB*	k.A.	k.A.	72,9	9,1	52,8	7 d
	[12]	20,0	4,5	16,6	0,4	4,2	MSB	17,7	5,0	72,6	10,6	46,7	35 d
	[15]	18,6	4,1	11,3	k.A.	k.A.	MSB	16,8	4,1	77,8	k.A.	k.A.	35 d
	[8]	19	2,8	18,3	k.A.	k.A.	Sil.extr.**	k.A.	k.A.	66,8	17,0	k.A.	30 d
	[2]	17,7	2,8	19,2	k.A.	k.A.	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	21,4	3,1	34,1	9,5	k.A.	120 d
Rotklee	[14]	k.A.	k.A.	α-Amino-N: 21 mg/g Sil.				k.A.	ohne	α-Amino-N: 99 mg/g Sil.			30 d
	[12]	17,2	3,9	10,1	0,4	2,5	MSB	15,1	4,3	56,3	6,1	33,5	35 d
	[15]	13,2	3,7	11,3	k.A.	k.A.	MSB	12,4	3,8	52,6	k.A.	k.A.	35 d
	[13]	13,4	3,5	11,4	0,4	3,5	MSB	k.A.	k.A.	45,8	6,3	32,5	7 d
Klee gras	[8]	21	3,1	8,2	k.A.	k.A.	Sil.extr.	k.A.	k.A.	40,8	8,6	k.A.	30 d
	[10]	19,9	1,9	18,1	k.A.	k.A.	ohne	k.A.	1,8	73,5	9,5	k.A.	50 d
	[10]	19,9	1,9	18,1	k.A.	k.A.	MSB+Zucker	k.A.	1,9	59,1	0,9	k.A.	50 d
Weißklee	[16]	10,6	4,0	19,3	α-Amino-N: 9,0			ohne	4,0	59,2	α-Amino-N: 28,7		48 h
Hornklee	[14]	k.A.	k.A.	α-Amino-N: 19 mg/g Sil.				k.A.	ohne	α-Amino-N: 103 mg/g Sil.			30 d
	[12]	17,6	3,8	11,5	0,3	3,9	MSB	16,4	4,1	57,8	5,0	34,1	35 d
Espartette	[8]	16	3,2	13,2	k.A.	k.A.	Sil.extr.	k.A.	k.A.	52,9	6,3	k.A.	30 d
	[12]	20,1	3,9	10,0	0,2	2,5	MSB	18,4	4,1	38,0	2,4	26,4	35 d
Kicher Tragant	[12]	17,7	4,1	16,1	0,5	3,7	MSB	15,0	4,7	54,6	11,3	27,6	35 d

Milchsäurebakterien, Luzernesilageextrakt, \*\*\* % der TS

\* Milchsäurebakterien, \*\* Luzernesilageextrakt, \*\*\* % der TS

[1] CAVALLARIN *et al.*, 2000; [2] CHARMLEY und VEIRA, 1990; [3] MCKERSIE und BUCHANAN-SMITH, 1982; [5] MUCK, 1987; [8] PAPADOPOULOS und MCKERSIE, 1983b; [9] SUTTON und VETTER, 1971; [10] CARPINTERO *et al.*, 1979; [12] ALBRECHT und MUCK, 1991; [13] JONES *et al.*, 1995c; [14] MCKERSIE, 1985; [15] OWENS *et al.*, 2002; [16] BRADY, 1960

Die Grünfütterleguminosen wurden im Mittel mit einem TS-Gehalt von 18,5 % frisch einsiliert, wobei die Luzerneproben im Mittel mit 19,6 % TS trockener waren als die Rotkleeproben mit 16,2 %. Die feuchteste Probe stellte der Weißklee mit 10,6 % TS dar (BRADY, 1960) [16]. Die Lagerdauer der Silagen variierte von nur zwei Tagen bis 120 Tagen, jedoch wurden von 13 der 23 zitierten Untersuchungen 30 bis 35 Tage als Silierdauer gewählt. Die Gesamt-N-Gehalte stiegen im Mittel aller Proben während der Silierung leicht von 3,4 auf 3,7 % der TS an. Vermutlich waren Trockenmasseverluste in Verbindung mit Respirations- und Fermentationsverlusten dafür verantwortlich (ALBRECHT und MUCK, 1991 [12]; OWENS *et al.*, 2002 [15]). Als Kennzeichen des Proteinabbaus während der Silierung (Proteolyse und Desmolyse) bei frisch einsilierten Grünfütterleguminosen ist eine deutliche Erhöhung der NPN-Anteile am Gesamt-N von 15,2 auf 59,8 % zu erkennen. Die Luzernesilagen wiesen einen höheren NPN-Anteil am Gesamt-N im Vergleich zu den Rotklee silagen auf (68,1 resp. 48,9 %). Den mit 34,1 % geringsten Anteil des NPN am Gesamt-N konnten CHARMLEY und VEIRA (1990) [2] durch den Zusatz von Ameisensäure zu frischer Luzerne erreichen. Da nur ALBRECHT und MUCK (1991) [12], JONES *et al.* (1995c) [13] und MUCK (1987) [5] eine Analyse des Ammoniaks und der freien Aminosäuren vor der Silierung vornahmen, ist nur von diesen Werten eine tendenzielle Aussage über das Ausmaß der Desmolyse bzw. der Proteolyse möglich. Im Mittel stiegen die Anteile sowohl von  $\text{NH}_3\text{-N}$  als auch vom freien AS-N von 0,4 auf 11,2 resp. von 3,6 auf 37,3 % am Gesamt-N an. Die Anteile des  $\text{NH}_3\text{-N}$  am Gesamt-N in den Silagen variierten jedoch sehr von 0,9 bis 47,4 %. Demzufolge ist das Ausmaß der Desmolyse sehr unterschiedlich ausgeprägt. Die Anteile des freien AS-N am Gesamt-N der Silagen waren dagegen weitaus einheitlicher und lagen zwischen 26,4 und 52,8 %. Erfolgt jedoch nur die alleinige Angabe der  $\alpha$ -Amino-N-Gehalte der Silagen (MCKERSIE, 1985) [14] oder der Anteile des  $\alpha$ -Amino-N am Gesamt-N (BRADY, 1960) [16], so kann bezüglich des jeweiligen Ausmaßes der beiden Prozesse Proteolyse und Desmolyse keine Aussage getroffen werden. Deutlich erkennbar ist aus diesen Werten jedoch die Zunahme der aus dem Proteinabbau stammenden Verbindungen. CARPINTERO *et al.* (1979) [10], CAVALLARIN *et al.* (2000) [1], CHARMLEY und VEIRA (1990) [2] und PAPADOPOULOS und MCKERSIE (1983b) [8] geben nur von den Frischsilagen den Anteil des  $\text{NH}_3\text{-N}$  am Gesamt-N an. Mit diesem Parameter ohne den entsprechenden Ausgangswert im unsilierten Pflanzenmaterial können keine wertenden Aussagen hinsichtlich der bei der Silierung stattgefundenen Desmolyse gemacht werden. Die Charakterisierung des Proteinabbaus während der Silierung **angewerkter** Grünfütterleguminosen ist in Tabelle 2.4 dargestellt.

Tabelle 2.4: Veränderungen ausgewählter Stickstofffraktionen (Gesamtstickstoff: Gesamt-N, Nichtproteinstickstoff: NPN, Ammoniakstickstoff: NH<sub>3</sub>-N, freier Aminosäurenstickstoff: fr. AS-N) während der Silierung angewerkter Grünfütterleguminosen

Pflanzenmaterial	Quelle	Nach dem Anwelken				Nach dem Silieren				NH <sub>3</sub> -N % des Gesamt-N	fr. AS-N	Silierdauer	
		TS %	Gesamt-N % d. TS	NPN	Silierzusatz	TS %	Gesamt-N % d. TS	NPN					
Luzerne	[1]	37,4	3,2	31,8	k.A.	k.A.	ohne	36,9	3,2	71,5	13,3	k.A.	120 d
	[3]	35	k.A.	0,9***	k.A.	k.A.	ohne	k.A.	k.A.	1,8***	k.A.	k.A.	21 d
	[4]	32	4,1	10,3	k.A.	k.A.	ohne	k.A.	4,1	66,0	k.A.	k.A.	110 d
	[9]	58,1	2,9	28,4	k.A.	k.A.	ohne	59,0	3,3	44,6	k.A.	k.A.	k.A.
	[2]	32,1	4,0	24,3	k.A.	k.A.	ohne	32,2	4,1	58,6	17,3	k.A.	150 d
	[17]	39	k.A.	17,5	0,6	5,7	ohne	k.A.	k.A.	41,3	11,3	17,9	90 d
	[19]	27	k.A.	6,0	0,3	4,0	ohne	k.A.	k.A.	60,2	5,6	46,9	28 d
	[18]	40	3,6	21,2	7,4	k.A.	ohne	k.A.	k.A.	55,0	19,8	k.A.	50 d
	[18]	40	3,6	21,7	7,7	k.A.	Zucker	k.A.	k.A.	52,3	17,5	k.A.	50 d
	[5]	35	3,4	28,1	0,7	6,3	Zucker	31,8	3,7	70,3	12,3	37,2	60 d
	[6]	33,3	3,7	18,1	k.A.	k.A.	MSB*	32,0	3,9	63,1	k.A.	k.A.	35 d
	[7]	34,0	5,0	27,9	k.A.	k.A.	MSB	33,2	5,0	62,7	k.A.	k.A.	35 d
Rotklee	[8]	28	k.A.	19,5	k.A.	k.A.	Sil.extr.**	k.A.	k.A.	58,5	19,5	k.A.	30 d
	[6]	32,8	3,4	15,7	k.A.	k.A.	MSB	29,9	3,6	38,5	k.A.	k.A.	35 d
	[7]	34,8	3,5	18,6	k.A.	k.A.	MSB	34,0	3,6	33,5	k.A.	k.A.	35 d
	[8]	55	k.A.	10,9	k.A.	k.A.	Sil.extr.	k.A.	k.A.	24,6	4,5	k.A.	30 d
Hornklee	[8]	26	k.A.	13,0	k.A.	k.A.	Sil.extr.	k.A.	k.A.	44,9	5,2	k.A.	30 d
Espartette	[11]	32,3	3,0	34,9	3,7	11,5****	ohne	32,4	3,0	53,2	12,7	27,7****	120 d
Kronwicke	[4]	29	4,3	16,7	k.A.	k.A.	ohne	k.A.	4,4	51,1	k.A.	k.A.	110 d

\* Milchsäurebakterien, \*\* Luzernesilageextrakt, \*\*\* % der TS, \*\*\*\* in mol AS·kg<sup>-1</sup> Gesamt-N

\* Milchsäurebakterien, \*\* Luzernesilageextrakt, \*\*\* % der TS, \*\*\*\* in mol AS·kg<sup>-1</sup> Gesamt-N

[1] CAVALLARIN *et al.*, 2000; [2] CHARMLEY und VEIRA, 1990; [3] MCKERSIE und BUCHANAN-SMITH, 1982; [4] MESSMAN *et al.*, 1994; [5] MUCK, 1987; [6] OWENS *et al.*, 1999a; [7] OWENS *et al.*, 1999b; [8] PAPADOPOULOS und MCKERSIE, 1983b; [9] SUTTON und VETTER, 1971; [10] CARPINTERO *et al.*, 1979; [11] CAVALLARIN *et al.*, 2005; [17] FAIRBAIRN *et al.*, 1988; [18] GRUM *et al.*, 1991; [19] MAKONI *et al.*, 1997

Die Herstellung der Anwelksilagen erfolgte aus den Grünfütterleguminosen im Mittel mit einem TS-Gehalt von 35,8 %. Die Silagen lagerten zwischen 21 und 150 Tagen. Aufgrund von Trockenmasseverlusten (MUCK, 1987) [5] in Verbindung mit Respiration und Fermentation (OWENS *et al.*, 1999a [6]; OWENS *et al.*, 1999b [7]) hatten die Silagen einen höheren Gesamt-N-Gehalt als das unsilierte angewelkte Pflanzenmaterial.

Der 20,3 %ige Anteil des NPN am Gesamt-N nach dem Anwelken stieg während der Silierung als Merkmal für den Proteinabbau auf durchschnittlich 52,8 % an. Die Anteile lagen zwischen 24,6 und 71,5 %, wobei ein deutlicher Unterschied zwischen den NPN-Anteilen der Silagen aus Luzerne und Rotklee bestand. Im Mittel lag der Anteil des NPN am Gesamt-N in den Anwelksilagen aus Rotklee bei 32,2 %. In den Anwelksilagen aus Luzerne betrug der mittlere Anteil dagegen 58,7 %. Auch die Anteile von  $\text{NH}_3\text{-N}$  und freiem AS-N am Gesamt-N als Kennzeichen für Desmolyse und Proteolyse stiegen während der Silierung an, jedoch sind nur tendenzielle Aussagen möglich, da diese Fraktionen in dem angewelkten Grüngut nur von CAVALLARIN *et al.* (2005) [11], FAIRBAIRN *et al.* (1988) [17] und MAKONI *et al.* (1997) [19] bestimmt wurden.

Der Vergleich der Werte der Arbeiten, in denen identisches Siliergut sowohl sofort nach dem Schnitt als auch nach dem Anwelken einsiliert wurde, zeigt die Vorteile der Anwelksilagen. Die von CARPINTERO *et al.* (1979) [10] angewelkt einsilierte Luzerne wies zwar einen identischen NPN-Anteil am Gesamt-N wie die frisch einsilierte auf, jedoch lief die Desmolyse deutlich geringer ab ( $\text{NH}_3\text{-N}$ -Anteil am Gesamt-N in der Anwelksilage: 13,3 %, in der Frischsilage 47,4 %). MCKERSIE und BUCHANAN-SMITH (1982) [3] erreichten durch ein Anwelken der von ihnen untersuchten Luzerne geringere NPN-Gehalte in der TS der Anwelksilagen im Vergleich zu den Frischsilagen aus identischem Pflanzenmaterial (Anwelksilage: 1,8 % NPN in der TS, Frischsilage: 2,1 % der TS). Die Ergebnisse von MUCK (1987) [5] und PAPADOPOULOS und MCKERSIE (1983b) [8] bestätigen diese Aussagen bei der Silierung von Luzerne. PAPADOPOULOS und MCKERSIE (1983b) [8] konnten die positive Wirkung des Anwelkens hinsichtlich der Reduzierung des Proteinabbaus während der Silierung auch beim Vergleich von sowohl frisch als auch angewelkt einsiliertem Rot- und Hornklee nachweisen. Auffällig ist die Tatsache, dass in den meisten Arbeiten nur der summarische NPN-Gehalt bestimmt wurde. Das Vorhandensein von Parametern wie  $\alpha$ -Amino-N oder freier Aminosäurenstickstoff und  $\text{NH}_3\text{-N}$  ist jedoch für die Beurteilung der Fermentations- und Proteinabbauprozesse notwendig.



## 2.3 Beeinflussung des Proteinabbaus im Silierprozess

Zur Beeinflussung des Proteinabbaus im Silierprozess lassen sich prinzipiell zwei Möglichkeiten ableiten. Es können sowohl externe als auch interne Faktoren differenziert werden, wobei deren Wirkungen nicht voneinander trennbar auszuwerten sind und ineinander übergehen. Wie jeder enzymatisch gesteuerte Prozess ist auch der Proteinabbau von pH-Wert, Temperatur und der Osmolalität abhängig. Die Einflussnahme auf das Ausmaß des Proteinabbaus im Silierprozess besteht in der Gestaltung der Fermentationsbedingungen, wobei z.B. durch ausreichend schnelle und tiefe Ansäuerung zum einen die Aktivität der pflanzlichen Proteasen zurückgeht (SLOTTNER und BERTILSSON, 2006) und zum anderen unerwünschte Bakterien unterdrückt werden (MCDONALD *et al.*, 1991; WINTERS *et al.*, 2001; WOOLFORD, 1984). Dies kann erreicht werden durch Silierzusätze oder durch Anwelken des Siliergutes. Weiterhin kommen pflanzenspezifische Unterschiede in Betracht, die z.B. bedingt sind durch sekundäre Inhaltsstoffe wie Tannine, die die Angreifbarkeit der Proteine mindern (ALBRECHT und MUCK, 1991), oder durch die vor allem im Rotklee enthaltenen Polyphenoloxidasen, die die Aktivität der Enzyme hemmen (JONES *et al.*, 1995b; JONES *et al.*, 1995c).

### 2.3.1 Externe Faktoren

#### *pH-Wert*

Der höchste Proteinabbau findet im pH-Wert-Bereich zwischen 5 und 7 statt (SEYFARTH *et al.*, 1989a). In Tabelle 2.5 sind Ergebnisse zu pH-Wert-Optimalbereichen von Enzymaktivitätsbestimmungen unterschiedlicher Autoren dargestellt.

Tabelle 2.5: Optimale pH-Wert-Bereiche verschiedener für die Silierung relevanter proteolytischer Pflanzenenzyme

Enzymquelle	pH-Optimum	Quelle
Weißklee	5,9 – 6,3	BRADY, 1961
Luzerne	5,5	FINLEY <i>et al.</i> , 1980
Welsches Weidelgras	5 - 7	HERON <i>et al.</i> , 1989
Rotklee	5,5	} JONES <i>et al.</i> , 1995a
Luzerne	5,5	
Gras	4,5 – 5,0	MACPHERSON, 1952
Luzerne		} MCKERSIE, 1981
- saure Proteinase	4,5	
- neutrale Proteinase	6,7	
- Carboxypeptidase	5,2	
- Aminopeptidase	6,5	
Luzerne	6,0	} MCKERSIE, 1985
Rotklee	6,5 und höher	
Hornklee	6,5 und höher	
Luzerne		} SCALET <i>et al.</i> , 1984
- Carboxypeptidase	5,5	
- saure Protease	4,5	

Der pH-Wert von frisch geschnittenen Pflanzen liegt um 6 (HERON *et al.*, 1989) und damit im Optimalbereich der für den Proteinabbau zunächst verantwortlichen pflanzlichen Proteasen. Zu Beginn der Silierung, d.h. während des Anwelkens, sind diese hauptsächlich für den Proteinabbau verantwortlich (CARPINTERO *et al.*, 1979). Der allgemein gültigen Forderung nach einer schnellen pH-Wert-Absenkung (HERON *et al.*, 1989; OWENS *et al.*, 2002; SLOTTNER und BERTILSSON, 2006) ist demzufolge bezüglich einer Reduzierung des Proteinabbaus während der Silierung uneingeschränkt zuzustimmen. Frühere Untersuchungen gingen davon aus, dass unter einem pH-Wert von 4,3 (MACPHERSON, 1952) bzw. 4,0 (BRADY, 1961) kein weiterer Proteinabbau mehr stattfindet. MACPHERSON (1952) inkubierte Grassäfte bis zu 14 Tage, die als experimentelle Silos dienten. Der pH-Wert sank in den Säften von 6,0 bis auf 4,0. Die NPN-Gehalte in den Säften stiegen mit der Zeit an, was als voranschreitender Proteinabbau gewertet wurde. Ab dem zweiten Tag, an dem ein pH-Wert von 4,3 gemessen wurde, erfolgte bis zum 14. Tag keine weitere Veränderung des NPN-Gehaltes der Säfte. Zusätzlich wurde ein Grassaft mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 3,8 eingestellt und ebenfalls 14 Tage inkubiert. In diesem experimentellen Silo, in dem der pH-Wert wahrscheinlich infolge der unvollständigen Dissoziation der Säure wieder auf 4,0 anstieg, war kein messbarer Proteinabbau nachweisbar.

Die Verallgemeinerung der Aussage, die MACPHERSON (1952) aus diesen Untersuchungen traf, dass unter einem pH-Wert von 4,3 kein weiterer Proteinabbau stattfindet, ist jedoch anzuzweifeln. Als Kennzeichen diente die NPN-Fraktion, die nach Abtrennung des Reinproteins durch Kochen extrahiert und bestimmt wurde. Eventuelle Veränderungen, die innerhalb dieser Fraktion während des Proteinabbaus zu vermuten sind (Umwandlungen von Peptiden in freie Aminosäuren und/oder Ammoniak) blieben unberücksichtigt. BRADY (1961), der die proteolytische Aktivität von Weißklee-Presssaft mit Gelatine bei pH-Werten von 1,0 bis 7,8 untersuchte (siehe Tabelle 2.6, Seite 26), konnte bei pH-Wert 3,9 keine Freisetzung von  $\alpha$ -Amino-N (Kennzeichen für die proteolytische Aktivität) messen. Enzymaktivitätsbestimmungen anderer Arbeiten kamen jedoch zu abweichenden Aussagen. JONES *et al.* (1995a) und MCKERSIE (1981), deren Methoden ebenfalls in Tabelle 2.6 vorgestellt werden, konnten proteolytische Aktivitäten bei einem pH-Wert von 3,0 und darunter nachweisen. JONES *et al.* (1995a) charakterisierten die proteolytische Aktivität (Anstieg des  $\alpha$ -Amino-N) in Extrakten aus Luzerne und Rotklee, die bei pH-Werten von 3 bis 9 zwei Stunden mit Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) oder Bovinem Serumalbumin (BSA) inkubiert wurden. Bei pH 3 waren noch proteolytische Aktivitäten sowohl in Luzerne als auch im Rotklee nachweisbar. Auch MCKERSIE (1981) ermittelte bei Extrakten von Luzerne einen Anstieg des  $\alpha$ -Amino-N-Gehaltes bei pH 3,0 nach einer zweistündigen Inkubation mit Hämoglobin. Er arbeitete in einem pH-Wert-Bereich von 2,5 bis 7,2. Inwieweit dieser Widerspruch der Arbeit von BRADY (1961) zu den Arbeiten von JONES *et al.* (1995a) und MCKERSIE (1981) hinsichtlich der Unwirksamkeit proteolytischer Enzyme unterhalb eines pH-Wertes von 4,0 auf den in den Enzymaktivitätsbestimmungen verwendeten Substraten (Gelatine, RubisCO, BSA und Hämoglobin) oder auf den spezifischen Eigenschaften der Pflanzenenzyme (von Weißklee, Luzerne und Rotklee) beruht, kann nicht bewertet werden. Durch die Arbeiten von HERON *et al.* (1989) werden jedoch die Aussagen von JONES *et al.* (1995a) und MCKERSIE (1981) bestätigt. Sie untersuchten die Veränderung der Reinprotein-N-Gehalte in  $\gamma$ -bestrahlten Extrakten aus Welschem Weidelgras, in denen durch Säure- bzw. Laugezugabe die pH-Werte auf 1 bis 7 eingestellt wurden. Die Bestrahlung unterband jegliche mikrobielle Aktivität, ohne die pflanzlichen Enzyme zu beeinflussen. Nach 120 Tagen war bis pH 2,3 eine Veränderung des Reinprotein-N-Gehaltes nachweisbar, die im pH-Wert-Bereich von 5,0 bis 7,0 am stärksten ausgeprägt war. Unter einem pH-Wert von 2,0 stieg die Hydrolyse wieder an. Um dieses Ergebnis zu interpretieren wurden die Grasextrakte zusätzlich hitzebehandelt. Diese Behandlungskombination sollte sicherstellen, dass keine Enzyme mehr aktiv waren und die

Veränderung des Reinprotein-N-Gehaltes auf nichtenzymatischen Vorgängen beruhte, d.h. vermutlich auf saurer Hydrolyse. HERON *et al.* (1989) konnten damit nachweisen, dass über einem pH-Wert von 2,0 keine saure Hydrolyse stattfand, der starke Anstieg des abgebauten Reinprotein-N-Gehaltes im pH-Wert-Bereich unter 2,0 vermutlich aber darauf zurückzuführen war. Aus dem Vergleich der beiden Behandlungsformen schlussfolgerten die Autoren, dass die Pflanzenproteasen auch unter einem pH-Wert von 3,0 aktiv waren, der Proteinabbau unter einem pH-Wert von 2,0 jedoch durch eine saure Hydrolyse begründet war. Die Tatsache, dass ein niedriger pH-Wert zur Reduzierung des Proteinabbaus führt, macht sich die Herstellung von Silagen mit chemischen Silierzusätzen (z.B. Ameisensäure, Schwefelsäure) von Nutzen. Der Proteinabbau wurde im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollsilagen vermindert (BARRY *et al.*, 1978a; BARRY *et al.*, 1978b; VAGNONI *et al.*, 1997; SLOTTNER und BERTILSSON, 2006), da durch die Zugabe der Säuren der pH-Wert unter das Wirkungsoptimum der Pflanzenproteasen abgesenkt wurde. Auch der Zusatz von geeigneten biologischen Zusätzen (Milchsäurebakterien, Gärsubstrat) führte zu einer schnelleren Initialisierung der Fermentation. Der damit in Verbindung stehende schnellere pH-Wert-Abfall reduzierte ebenfalls den Proteinabbau (CARPINTERO *et al.*, 1979; SLOTTNER und BERTILSSON, 2006).

### *Temperatur*

Der Temperaturbereich mit der stärksten Wirkung auf den Proteinabbau liegt zwischen 40 und 50°C. Die Enzymaktivitätsbestimmung von BRADY (1961) mit Weißkleeproteasen ergab eine Optimaltemperatur von 45°C. FINLEY *et al.* (1980) wiesen nach Untersuchungen mit Luzerneproteasen 50°C aus. MCKERSIE (1981) gab für die sauren und neutralen Proteinasen der Luzerne 50°C als Wirkungsoptimum an, für die Carboxy- und Aminopeptidasen 40°C. Da jedoch diese Enzymaktivitätsbestimmungen die Wirkung der Temperatur auf den Fermentationsverlauf unberücksichtigt lassen, führten MUCK und DICKERSON (1988) Versuche mit Luzernesilagen durch, die bei drei verschiedenen Temperaturen (15, 25 und 35°C) gelagert wurden. Die Erhöhung der Temperatur führte zu einem stärkeren Proteinabbau, der durch höhere NPN-Gehalte in den Silagen gekennzeichnet war. Dieser Effekt war jedoch schwächer ausgeprägt als aus den Ergebnissen der Enzymaktivitätsbestimmungen von FINLEY *et al.* (1980) und MCKERSIE (1981) angenommen wurde. MUCK und DICKERSON (1988) sahen als Gründe die aktivierende Wirkung der Erhöhung der Temperatur von 15 auf 35°C auf die Silagemikroflora, die demzufolge zu einer erhöhten Fermentation mit einem schnelleren pH-Wert-Abfall führte. Als

Resümee empfehlen MUCK und DICKERSON (1988) jedoch, die Temperatur zu kontrollieren bzw. zu reduzieren, um die Qualität des Silageproteins zu verbessern.

#### *Osmolalität (TS-Gehalt)*

Es wird allgemein postuliert, dass durch eine Erhöhung der Trockensubstanz des Siliergutes die Wasseraktivität zurückgeht (GREENHILL, 1964b). Die Wasseraktivität und die Osmolalität korrelieren negativ miteinander (SWEENEY und BEUCHAT, 1993), so dass mit steigender Trockensubstanz auch die Osmolalität steigt. Durch die steigende Osmolalität steht weniger Wasser zur Verfügung. Da die Reaktion der Proteinhydrolyse jedoch Wasser benötigt, verläuft sie ohne oder mit weniger Wasser langsamer (SLOTTNER und BERTILSSON, 2006). Desmolytisch wirkende Mikroorganismen verfügen über eine im Vergleich zu MSB geringere Osmotoleranz, wodurch ein Anwelken zur Hemmung ihres Wachstums (WIERINGA, 1958) und damit zur Reduzierung der Desmolyse führt. Die positive Wirkung des Anwelkens und damit einer höheren Osmolalität auf eine Reduzierung des Proteinabbaus während der Silierung wird in vielen Publikationen beschrieben (CARPINTERO *et al.*, 1979; MCKERSIE und BUCHANAN-SMITH, 1982; PAPADOPOULOS und MCKERSIE, 1983b; MUCK, 1987; LUCHINI *et al.*, 1997). In Anwelksilagen sind weniger NPN-Verbindungen enthalten (GARCIA *et al.*, 1989), wodurch die Verwertung des Proteinstickstoffs im Pansen verbessert werden kann (TAMMINGA und VERSTEGEN, 1992). HRISTOV und SANDEV (1998) konnten nachweisen, dass durch das vorherige Anwelken von Luzerne die Löslichkeit des Rohproteins und der ruminale Proteinabbau im Vergleich zu frischen Luzernesilagen vermindert wurden.

### 2.3.2 Interne Faktoren

#### *Tannine*

Tannine sind phenolische sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die im Pflanzenreich sehr weit verbreitet sind (MIN *et al.*, 2003). Sie besitzen die Fähigkeit, sich an Proteine zu binden (AERTS *et al.*, 1999a) und sie zu fällen (SWAIN, 1977). Tannine kommen im Wesentlichen in kondensierter und in hydrolysierbarer Form vor (SWAIN, 1977). In Futterpflanzen überwiegen kondensierte Tannine (MCLEOD, 1974; SARKAR *et al.*, 1976), die in moderater Konzentration (2 - 4 % der TS) den mikrobiellen Proteinabbau im Pansen reduzieren. Dadurch kann der Proteinmetabolismus der Wiederkäuer verbessert werden (AERTS *et al.*,

1999a). Das Futterprotein wird durch die Pansenmikroben verlangsamt zu Ammoniak abgebaut. Dadurch erhöht sich der Proteinabfluss aus dem Pansen und die Aminosäurenabsorption im Dünndarm wird verbessert (REED, 1995; AERTS *et al.*, 1999b). Ab einer Konzentration über 6 % der TS wird die Futteraufnahme herabgesetzt (AERTS *et al.*, 1999a).

Das Verdauungssystem von Nichtwiederkäuern reagiert allerdings sehr empfindlich auf Tannine im Futter, selbst bei geringen Konzentrationen. CASTRO ALEGRIA (1999) gibt als Grenzwert bei der Broilerfütterung mit Sorghum einen Tanningehalt (kondensierte Tannine) von 0,5 % der TS an. Tannine führen in monogastrischen Tieren zu einer erniedrigten Proteinverdaulichkeit. Schon bei einem Tanningehalt von 0,4 % der TS in Erbsen geht die Rohproteinverdaulichkeit von 85 % (bei Erbsen ohne Tannin) auf 75 % zurück (POPPE und MEIER, 1993). Diese Depression ist auf die Bindung der Tannine an das Futterprotein, das endogene Protein (VANLEEUEWEN *et al.*, 1995) sowie direkt an die Enzymproteine im Verdauungstrakt (LOW und ZEBROWSKA, 1989) zurückzuführen.

In Silierversuchen mit Leguminosen, die einen unterschiedlichen Tanningehalt aufwiesen, wurde nachgewiesen, dass der Schutz des Proteins vor dem Abbau durch die Tannine auch während der Silierung gegeben ist (ALBRECHT und MUCK, 1991). Mit Hilfe linearer Regressionen der Ergebnisse zweier Anbaujahre konnte die negative Korrelation zwischen Tanningehalt des zu silierenden Gutes und den in den Silagen analysierten NPN-Verbindungen hergestellt werden. ALBRECHT und MUCK (1991) erklärten diese positive Wirkung der Tannine sowohl durch die Inhibierung pflanzlicher und mikrobieller Proteasen als auch durch die Bindung an das in den Pflanzen in hohen Konzentrationen vorkommende (OHSHIMA *et al.*, 1979) und während der Silierung besonders abbaugefährdete (FAIRBAIRN *et al.*, 1988) Protein RubisCO (MARTIN und MARTIN, 1983), welches somit vor dem Abbau geschützt wird.

Tannine wurden auch als Silierzusatz eingesetzt. CAVALLARIN *et al.* (2002a) verwendeten Kastanien-Tannin bei der Silierung von Luzerne und erzielten im Vergleich zu den unbehandelten Silagen niedrigere Ammoniak- und NPN-Gehalte. Auch bei der Silierung von Deutschem Weidelgras konnte der Proteinabbau durch den Tanninzusatz reduziert werden (SALAWU *et al.*, 1999). Mit diesem Material wurden in-situ Versuche mit Kühen durchgeführt. Diese zeigten, dass das Protein der tanninbehandelten Silagen auch vor dem Abbau im Pansen geschützt und anschließend im Darm ohne nachteiligen Effekt verdaut wurde. Auch für die Nichtwiederkäuer können durch die Silierung tanninhaltiger Futtermittel die Vorteile der Tannine nutzbar gemacht werden. Der Proteinabbau kann während der

Silierung reduziert werden, die Tannine selbst werden bei der Silierung z.T. abgebaut (HARTMANN *et al.*, 2005; OTT *et al.*, 2005). Die Silage kann somit das Aminosäureangebot für den Nichtwiederkäuer (güste und niedertragende Sauen) verbessern, ohne den antinutritiven Einfluss der Tannine aufzuweisen.

#### *Polyphenoloxidasen (PPO)*

PPO sind wahrscheinlich in allen Pflanzen enthalten. Sie sind bifunktionale, kupferhaltige Oxidasen mit Catecholase- und Cresolaseaktivität. PPO werden für die sogenannte Bräunungsreaktion verantwortlich gemacht. In Anwesenheit von Sauerstoff werden dabei phenolische Verbindungen zunächst zu Catechol oxidiert, welches in einem zweiten Schritt zu o-Quinon oxidiert wird (CLIMENT *et al.*, 2001). Die Quinone können entweder zu Melaninen polymerisieren oder, ähnlich wie Tannine, Komplexe mit Proteinen eingehen (FOTHERGILL *et al.*, 2004). Diese Reaktion der Quinone wird als Ursache für eine Reduzierung des Proteinabbaus während der Silierung angesehen (SULLIVAN *et al.*, 2003). Schon bei ALBRECHT und MUCK (1991) fiel auf, dass Rotklee trotz fehlenden Tanningehaltes einen im Vergleich zu Luzerne geringeren Proteinabbau während der Silierung zeigte. JONES *et al.* (1995b) untersuchten 14 verschiedene Leguminosen hinsichtlich PPO-Aktivität, Bräunungsreaktion und Gehalt an löslichen Phenolen. Nur bei Rotklee konnte eine messbare PPO-Aktivität nachgewiesen werden sowie eine Bräunung des Extraktes. Alle Leguminosen enthielten lösliche Phenole. Silierversuche mit Rotklee und Luzerne, die daraufhin angelegt wurden, bestätigten die von ALBRECHT und MUCK (1991) gefundenen Unterschiede. Trotz gleicher TS-Gehalte, pH-Wert-Verläufe während der Silierung und erreichter End-pH-Werte der Silagen, war der Proteinabbau in Rotkleesilagen um 40 % geringer als in Luzernesilagen (JONES *et al.*, 1995c). Untersuchungen von HATFIELD und MUCK (1999), LEE *et al.* (2004) und WINTERS und MINCHIN (2002) führten zu analoger Aussage. Aber nicht nur eine hohe PPO-Aktivität ist verantwortlich für die Inhibierung des Proteinabbaus, sondern auch das Vorhandensein ausreichender Substrate, wie die der o-Diphenole. Dies konnte mit Hilfe von transgener Luzerne nachgewiesen werden, die PPO-Gene von Rotklee exprimiert. Der Proteinabbau war in Extrakten dieser transgenen Luzerne mit Zugabe von o-Diphenolen im Vergleich zu Extrakten ohne Zugabe stark reduziert (SULLIVAN *et al.*, 2004; SULLIVAN und HATFIELD, 2006).

## 2.4 Enzymaktivitätsbestimmungen

Enzymaktivitätsbestimmungen erfolgen in Medien tierischer, mykotischer, mikrobieller oder pflanzlicher Herkunft generell nach der gleichen Vorgehensweise. Die enzymatisch wirksame Substanz wirkt auf ein spezifisches Substrat ein und setzt dabei Abbauprodukte frei. Das Maß der Freisetzung dieser Abbauprodukte wird mit unterschiedlichen Einheiten als die Aktivität des Enzyms definiert. Der „Verdauungsprozess“, wie von KUNITZ (1947) titulierte, findet dabei unter spezifischen Bedingungen statt. Da auch die Abbauprodukte selbst je nach Substrat und einwirkendem Enzym differierenden Stoffgruppen angehören, sind die dem Abbauprozess anschließenden Analysen der Produkte ebenfalls nicht einheitlich. Tabelle A.1 im Anhang gibt einen Überblick zu ausgewählten Enzymaktivitätsbestimmungen ausgewählter Arbeiten (TABATABAI und BREMNER, 1969; DHINDSA *et al.*, 1981; BENEYTOUT *et al.*, 1988; CHERNIKOVA *et al.*, 2000; POINSSOT *et al.*, 2003; ROHN *et al.*, 2003; HERNÁNDEZ-ROMERO *et al.*, 2005; JONES *et al.*, 2005).

In zahlreichen Arbeiten wird wegen der Bedeutung des Proteinabbaus bei der Konservierung von Futtermitteln die proteolytische Aktivität in Pflanzenextrakten bestimmt. Tabelle 2.6 zeigt eine Auswahl direkt an Grünfütterleguminosen entwickelter Methoden sowie grundlegende Methoden, auf die sich andere Arbeiten bei der Quantifizierung der proteolytischen Aktivität in pflanzlichem Material beziehen.



Tabelle 2.6: Bestimmung der proteolytischen Aktivität (PA) bei unterschiedlichen Pflanzen mit verschiedenen Testproteinsubstraten

Test-protein-substrat	Pflanze; Inkubations-medium	Inkubation bei	Reaktions-ende mit	Bewertung der PA	Quelle
<b>ohne</b>	Luzerne, Rotklee, Hornklee; <i>Extrakt mit Wasser und Chloramphenicol</i>	40°C, bis 72 h	TCE*	Anstieg des $\alpha$ -Amino-N	MCKERSIE, 1985
<b>Azo-albumin</b>	k.A.; <i>allgemeine Methode für Enzymlösungen</i>	37°C, 30 min	TCE	Absorptions-änderung bei 450 nm	PLANTNER, 1991
<b>Azo-casein</b>	Luzerne; <i>Extrakt mit Natriumphosphatpuffer</i>	40°C, k.A.	k.A.	Anstieg des $\alpha$ -Amino-N	MCKERSIE und BUCHANAN-SMITH, 1982
	Taumellolech; <i>entsalzter Extrakt mit Tris-HCl (EDTA, Mercaptoethanol)</i>	37°C, 4 h	TCE	Absorptions-änderung bei 405 nm	MORRIS <i>et al.</i> , 1996
	Luzerne, Rotklee, Hornklee; <i>Extrakt mit Natriumdisulfit</i>	40°C, 2 h	Perchlorid Säure	Absorptions-änderung bei 400 nm	PAPADOPOULOS und MCKERSIE, 1983b
<b>Casein</b>	Luzerne; <i>Presssaft</i>	38°C, 24 h	TCE	Anstieg des $\alpha$ -Amino-N	FINLEY <i>et al.</i> , 1980
	Weißklee, Saatwicke; <i>Presssaft</i>	25°C, 24 h	TCE	Anstieg des NPN	SINGH, 1962
	Bohnenblätter; <i>Extrakt aus Saft mit N-substituierten Dipeptiden</i>	30°C, bis 2 h	Hagihara Reagent	Absorptions-änderung bei 280 nm	WELLS, 1968
<b>Gelatine</b>	Weißklee; <i>Presssaft</i>	45°C, 5 h	k.A.	Anstieg des $\alpha$ -Amino-N	BRADY, 1961
<b>Hämo-globin</b>	Luzerne; <i>Extrakt mit Natriumphosphatpuffer</i>	30°C, 2 h	TCE	Anstieg des $\alpha$ -Amino-N	MCKERSIE, 1981
	Luzerne; <i>entsalzter Extrakt mit Kaliumphosphatpuffer</i>	37°C, 90 min	TCE	Anstieg des $\alpha$ -Amino-N	SCALET <i>et al.</i> , 1984
<b>Rubis-CO<sup>**</sup>, BSA<sup>***</sup></b>	Luzerne, Rotklee; <i>Extrakt mit Phosphatpuffer</i>	37°C, bis 4 h	TCE	Anstieg des $\alpha$ -Amino-N	JONES <i>et al.</i> , 1995a

\* Trichloressigsäure

\*\* Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase

\*\*\* Bovines Serumalbumin

Die verwendeten Testproteinsubstrate sind bis auf eine Ausnahme (JONES *et al.*, 1995a: mit RubisCO) tierischen Ursprungs. Da jedoch die proteolytische Aktivität pflanzlicher Materialien bestimmt werden soll, ist die Tauglichkeit von Testproteinsubstraten tierischen Ursprungs fraglich. Die meisten Methoden verwenden aufwändig hergestellte Pflanzenextrakte, die für die Anwendung in der Silierpraxis kaum einsetzbar sind. Die Inkubationstemperaturen variieren von 25 bis 45°C, überwiegend laufen die Methoden bei ca. 40°C ab. Auch die Dauer der Inkubation wurde mit 30 min bis 72 h sehr unterschiedlich gewählt. Damit scheint die Vergleichbarkeit der mit diesen Methoden ermittelten proteolytischen Aktivität nicht gegeben zu sein. Die Mehrzahl der Autoren bewertet die proteolytische Aktivität anhand des Anstieges des  $\alpha$ -Amino-N in den Inkubationsmedien, der bei der Spaltung der Peptidkette des Testproteinsubstrates frei wird. Die freien  $\alpha$ -Amino-N-Gruppen werden mit Ninhydrin bestimmt (Ausnahme BRADY, 1961: Bestimmung über Kupferchelatbildung). Dabei entsteht eine blau-violette Färbung, die zurückzuführen ist auf das Anion des sich bildenden Diketohydrindylidenediketohydrindiamin (YEMM und COCKING, 1955), nach dessen Entdecker auch als „Ruhemann's Purple“ bezeichnet (MACFADYEN, 1950). Durch photometrische Extinktionsmessung kann an Hand der Intensität der Farbausbildung der Gehalt des  $\alpha$ -Amino-N bestimmt werden. In Abbildung A.1 im Anhang ist die vereinfachte Ninhydrin-Reaktion nach DOSE (1996) dargestellt. WINTERS *et al.* (2002), die in ihrer Arbeit den  $\alpha$ -Amino-N nach ROSEN (1957) bestimmen, untersuchten relevante in Silagen vorkommende Stickstoffverbindungen, die aufgrund ihrer freien  $\alpha$ -Amino-N-Gruppe ebenfalls mit Ninhydrin reagieren. Danach führt vor allem Ammoniak ebenfalls zu einer Anfärbung. Die Bestimmung des  $\alpha$ -Amino-N ist somit eine summarische Größe, was bei der Interpretation beachtet werden sollte. Als weitere mögliche Bewertungskriterien neben der Bestimmung des Gehaltes der Abbauprodukte aus dem Proteinabbau selbst sind die durch diese hervorgerufenen veränderten chemischen bzw. physikalischen Eigenschaften zur Charakterisierung der proteolytischen Aktivität denkbar. Die beim Proteinabbau gebildeten Aminosäuren können sowohl die Osmolalität erhöhen als auch durch ihren Zwitterioncharakter die Puffereigenschaften verändern. Beide Kriterien wurden nach Voruntersuchungen als nicht brauchbar eingestuft (HOEDTKE, 2002) und finden auch in den hier ausgewerteten Literaturarbeiten keine Beachtung.

### 3 Aufgaben- und Zielstellung

Sowohl die Proteolyse als auch die Desmolyse sind bei der Silagebereitung insbesondere aus Grünfütterleguminosen als unerwünschte Fermentationsvorgänge anzusehen. Sie reduzieren beim Wiederkäuer den Fluss von Futteramino­säuren in den Dünndarm und erhöhen die Ammoniak-Peaks bei der Pansenfermentation des Futterrohproteins (SID­DONS *et al.*, 1985). Für den Nichtwiederkäuer, der in bestimmten Phasen (z.B. güste und niedertragende Sauen) mit Silagen sinnvoll ernährt werden kann, gehen durch den Proteinabbau während der Silierung die zur Bedarfsdeckung notwendigen Aminosäuren verloren (ROSE *et al.*, 1994). Aus der Desmolyse stammender Ammoniak ist oft auch als Indikator von ungünstigen Siliervorgängen zu werten (MCDONALD *et al.*, 1991). Die Reduzierung sowohl der Proteolyse als auch der Desmolyse bei der Silierung ist deshalb erforderlich, um gärbio­logisch einwandfreie und ernährungsphysiologisch wertvolle Silagen aus eiweißreichen Grünfütterleguminosen für die Proteinversorgung landwirtschaftlicher Nutztiere herzustellen. Im Vorfeld ist dafür die Kenntnis über das Proteinabbaupotential des einzusilierenden Pflanzenmaterials notwendig, das sich zusammensetzt aus der proteolytischen Aktivität sowohl pflanzlicher als auch mikrobieller Enzyme und aus der Abbauanfälligkeit des Pflanzenproteins. Die Literaturschau zeigte, dass nur wenige, vor allem ältere Methoden die Grundlage für die Bestimmung der proteolytischen Aktivität von für die Silierung vorgesehenen Pflanzenmaterialien bilden. Hauptsächlich wird in den Methoden mit tierischen Testprotein­substraten gearbeitet, deren Tauglichkeit in Frage gestellt werden muss (JONES *et al.*, 1995a). Weiterhin werden als Enzymmedium aufwändig hergestellte Pflanzenextrakte verwendet, die für die Anwendung in der Silierpraxis kaum einsetzbar sind. Zur Beurteilung der Abbauanfälligkeit des Pflanzenproteins ist eine Charakterisierung der Zusammensetzung der Stickstofffraktionen der wässrigen Phase des Pflanzenmaterials erforderlich (GIVENS, 2000), aus deren Veränderung der Proteinabbau während der Silierung quantifiziert werden kann. Der in Folge des Proteinabbaus ansteigende NPN-Anteil am Gesamtstickstoff ist nachgewiesen. Allerdings erfolgt durch die Analyse dieser summarischen Stickstofffraktion keine Kennzeichnung der Prozesse Proteolyse und Desmolyse selbst. Nur aus wenigen Arbeiten sind darüber Ergebnisse abzuleiten. Externe und interne Faktoren, die sowohl die Proteolyse als auch die Desmolyse beeinflussen, sind aus der Literatur bekannt. Es liegen keine genauen Kenntnisse über den Einfluss der Faktoren bei der Silierung sowie über deren Wechselwirkungen vor.

Als wesentliche Aufgaben der vorliegenden Arbeit wurden daher folgende Punkte abgeleitet:

1. Konzeption einer in-vitro Methode zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität in Grünfütterleguminosen,
2. Quantifizierung der Wirkung von potentiellen Einflussfaktoren auf den Proteinabbau unter in-vitro Bedingungen,
3. Quantifizierung der Veränderung ausgewählter Stickstofffraktionen zur Kennzeichnung von Proteolyse und Desmolyse während der gesamten Silierung.

Durch die experimentelle Bearbeitung dieser Schwerpunkte soll die Prüfung nachstehender Hypothesen erfolgen:

1. Als repräsentatives Substrat der wässrigen Phase von Grünfütterleguminosen und deren Silagen dient der durch mechanische Druckeinwirkung hergestellte Presssaft. Die Höhe des Abpressdruckes hat keinen Einfluss auf den Gehalt von Trockensubstanz und ausgewählten Stickstofffraktionen.
2. Die proteolytische Aktivität von Grünfütterleguminosen kann unter einheitlichen Bedingungen anhand eines definierten Kriteriums gemessen werden.
3. Die an das wässrige Milieu gebundene proteolytische Aktivität kann im Presssaft quantifiziert werden. Sie ist zur Einschätzung des zu erwartenden Proteinabbaus während der Silierung mit dem Parameter „freigesetzter  $\alpha$ -Amino-N aus der Testproteinlösung je g Gesamtstickstoff im Presssaft“ geeignet.
4. Als enzymatisch gesteuerter Prozess unterliegt der Proteinabbau während der Silierung dem Einfluss von externen und internen Faktoren (pH-Wert, Osmolalität, Temperatur, Silierzusätze, sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe). Auf Basis des Rostocker Fermentationstests nach PIEPER *et al.* (1989) und ZIERENBERG (2000) werden deren Einfluss sowie Wechselwirkungen der Faktoren unter dem Einfluss der Fermentation quantifizierbar.
5. Die Quantifizierung der Prozesse Proteolyse und Desmolyse erfordert Parameter, die einerseits eindeutige Aussagen ermöglichen, aber andererseits auch mit einem vertretbaren Aufwand bestimmbar sind.
6. Die Validierung der zuvor unter in-vitro Bedingungen gewonnen Erkenntnisse hinsichtlich der Beeinflussbarkeit des Proteinabbaus führt mit Modellsilagen zu gleichen Ergebnissen.

## 4 Experimentelle Untersuchungen zur proteolytischen Aktivität und zum Proteinabbau während der Konservierung eiweißreicher Grünfütterleguminosen

### 4.1 Material und Methoden

#### 4.1.1 Auswahl und Aufbereitung des Pflanzenmaterials

##### *Ernte und Lagerung des Pflanzenmaterials*

Das für die Untersuchungen verwendete Pflanzenmaterial ist mit dem Erntetermin, dem Vegetationsstadium, dem TS-Gehalt und dem Hinweis auf dessen Verwendung in Tabelle 4.1 ausgewiesen.

Tabelle 4.1: Verwendetes Pflanzenmaterial und Einteilung nach Versuchsabschnitten

Pflanzenmaterial	Erntetermin	Vegetationsstadium	TS-Gehalt	hergestellte Anwelkstufe: TS-Gehalt	Verwendung
<b>Rotklee</b>	03.06. 2005	Beginn Blüte	15,9%	-	Herstellung von <b>Mischmodellsilagen</b>
<b>Hornklee</b>	31.10. 2005	in der Blüte	20,1%	-	Herstellung von <b>Mischmodellsilagen</b>
<b>Luzerne</b>	13.05. 2004	vor Blüte	13,6%	1: 21,2% 2: 22,5% 3: 27,7%	Voruntersuchungen zur <b>Konzeption der in-vitro Methode</b> ; Herstellung von <b>Modellsilagen</b>
	19.08. 2004	Beginn Blüte	17,9%	1: 25,1% 2: 32,4% 3: 41,7%	Presssaftcharakterisierung; <b>Quantifizierung der Beeinflussbarkeit des Proteinabbaus durch externe Faktoren (in-vitro)</b> ; Herstellung von <b>Mischmodellsilagen</b>
<b>Kleegras</b>	15.05. 2003	Rotklee: vor Knospe,	16,7%	1: 23,0%	Herstellung von <b>Modellsilagen</b>
		Weidelgras: vor Ährenschieben		2: 31,4% 3: 37,9%	

Darüber hinaus wurden verschiedene Rotkleearten im Vegetationsverlauf und zu einem definierten Erntetermin im Folgeaufwuchs geerntet. Dieses Pflanzenmaterial diente zur Quantifizierung der Beeinflussbarkeit der proteolytischen Aktivität durch interne Faktoren unter in-vitro Bedingungen (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Rotkleesorten im Vegetationsverlauf für Untersuchungen zur Beeinflussbarkeit der proteolytischen Aktivität durch interne Faktoren unter in-vitro Bedingungen

Ernte-termin	Auf-wuchs	Vegetationsstadium	Rotkleesorten	
			diploid (2n)	tetraploid (4n)
12.05. 2005	1	vor Knospe	Diplomat, Pirat	Mars, Maro
25.05. 2005	1	Beginn Knospe	Diplomat, Pirat	Mars, Maro
03.06. 2005	1	Beginn Blüte	Diplomat, Pirat, Harmonie, Melodie, Milvus	Mars, Maro, Greif, Titus, Marathon
14.06. 2005	1	Blüte	Diplomat, Pirat	Mars, Maro
13.07. 2005	2	Beginn Blüte	Diplomat, Pirat, Harmonie, Melodie, Milvus	Mars, Maro, Greif, Titus, Marathon

Der **Rotklee** und der **Hornklee** wurden direkt nach dem Schnitt auf -20°C gefroren, im gefrorenen Zustand mit einem handelsüblichen Gartenhäcksler auf ca. 3 cm zerkleinert, gemischt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Die **Luzerne (Erntetermin 13.05.2004)** und das **Klee gras** wurden nach dem Schnitt zum Anwelken auf dem Feld belassen, nachdem jeweils eine Probe des frischen Pflanzenmaterials abgenommen wurde. Das frische Pflanzenmaterial und jeweils drei Anwelkstufen wurden mit einem Exakthäcksler auf ca. 3 cm zerkleinert, gemischt und bei -20°C gelagert.

Die **Luzerne (Erntetermin 19.08.2004)** wurde direkt nach der Ernte in frischem Zustand mit dem Exakthäcksler auf ca. 3 cm zerkleinert und gemischt. Im Umlufttrockenschrank wurden bei 30°C drei Anwelkstufen unter Laborbedingungen hergestellt, so dass gleiches Pflanzenmaterial in vier unterschiedlichen TS-Stufen bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C lagerte.

### *Herstellung von Modellsilagen*

Die Modellsilagen wurden sowohl aus frischem als auch aus verschieden stark angewelktem Pflanzenmaterial hergestellt. Zu dem gut zerkleinerten und durchmischten Pflanzenmaterial wurden gegebenenfalls Silierzusätze (Milchsäurebakterienpräparat (*Lactobacillus plantarum*) in der vom Hersteller empfohlenen Dosis ( $3 \cdot 10^5$  KbE/g Frischmasse (FM)), Gärsubstrat (Melasse)) zugegeben und abermals gut durchmischt. Danach wurden ca. 500 g (bei zunehmenden TS-Gehalt bis zu 3 kg) des Probenmaterials in einen luftdichten Plastikbeutel

gefüllt. Nach der Evakuierung des Beutels mit einer Vakuumpumpe wurde der Beutel mit straff schließenden Gummiringen luftdicht verschlossen und zusätzlich mit Klebeband gesichert. Zur Sicherheit wurde der so abgedichtete Beutel wiederum in einen Beutel überführt, der ebenfalls nach Evakuierung mit Gummiringen und Klebeband luftdicht verschlossen wurde. Die Fermentation in den Modellsilagen wurde zum jeweiligen Öffnungstermin unterbrochen, indem die Modellsilagen auf -20°C gefroren wurden. Die weitere Aufbereitung erfolgte nach schonendem Auftauen.

#### *Varianten der Modellsilagen*

Die aus der Luzerne (Erntetermin 13.05.2004) hergestellten Modellsilagen sind in Tabelle 4.3 dargestellt. Es wurden drei Modellsilagen je Behandlung für sieben Öffnungstermine (1, 3, 6, 12, 24, 48 und 96 Tage) von allen Anwelkstufen hergestellt und bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 4.3: Varianten im Silierversuch mit Luzerne (Erntetermin 13.05.2004); n=3

<b>Luzerne</b> (Erntetermin 13.05.2004)	Frisch 13,6 % TS	Anwelk1 21,2 % TS	Anwelk2 22,5 % TS	Anwelk3 27,7 % TS
Behandlung:				
ohne	x	x	x	x
mit Melasse (4 % der FM)	x			
mit Melasse und MSB* ( $3 \cdot 10^5$ KbE/g FM)	x	x	x	
mit MSB ( $3 \cdot 10^5$ KbE/g FM)				x

\* MSB: Milchsäurebakterienpräparat (*Lactobacillus plantarum*)

Obwohl die TS-Unterschiede der Anwelkstufen gering waren, werden die Ergebnisse separat dargestellt. Aus dem Pflanzenmaterial der 1. Anwelkstufe wurden ca. 6 Stunden nach dem Schnitt Modellsilagen hergestellt. Das übrige Pflanzenmaterial lag über Nacht auf dem Feld und wurde am nächsten Morgen nach einer Feldliegezeit von ca. 24 Stunden einsiliert (Anwelkstufe 2). Die nur geringen TS-Unterschiede beruhen daher offensichtlich auf einer Wiederbefeuchtung des Pflanzenmaterials durch Tauwasser. Da jedoch Unterschiede zwischen diesen beiden Anwelkstufen hinsichtlich des Gehaltes an ausgewählten N-Fractionen und der proteolytischen Aktivität vorhanden waren, kam es während dieser längeren Feldliegezeit anscheinend zu Veränderungen des Zellwassers an sich.

Für die Untersuchungen der Presssaftcharakterisierung (Luzerne: Erntetermin 19.08.2004) wurden je sechs Modellsilagen aus allen vier TS-Stufen (17,9; 25,1; 32,4 und 41,7 %) mit Zusatz von MSB ( $3 \cdot 10^5$  KbE/g FM) hergestellt. Diese Modellsilagen lagerten bei Raumtemperatur für 48 Tage.

Von dem Klee gras wurden aus zwei Anwelkstufen (16,7 und 37,9 % TS) Modellsilagen ohne Zusätze hergestellt (n=3), die zu drei Terminen (nach 1, 3 und 96 Tagen) geöffnet wurden. Um die Veränderung der Zusammensetzung der N-Fractionen im Verlauf des Anwelkens zu untersuchen, wurden zwischen diesen beiden TS-Stufen zwei weitere Anwelkstufen (23,0 und 31,4 % TS) beprobt.

Zum Nachweis des Einflusses von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen (PPO, Tannine) auf den Proteinabbau wurden je drei Mischmodellsilagen im Verhältnis 2:1, bezogen auf die Frischmasse, in den Varianten ohne Zusätze und mit MSB ( $3 \cdot 10^5$  KbE/g FM) in Kombination mit Melasse (4 % der FM) hergestellt. Zum Vergleich dienten Modellsilagen aus reiner Luzerne (Erntetermin 19.08.2004). Die Lagerdauer betrug 48 Tage:

- Luzerne (Erntetermin 19.08.2004) und Rotklee (Erntetermin 03.06.2005): Einfluss von Polyphenoloxidasen (PPO),
- Luzerne (Erntetermin 19.08.2004) und Hornklee (Erntetermin 31.10.2005): Einfluss von Tanninen,
- Luzerne (Erntetermin 19.08.2004): reine Luzernesilagen zum Vergleich.

#### *Aufbereitung des Pflanzenmaterials*

Ein Teil des schonend aufgetauten Pflanzenmaterials (unsiliert und siliert) wurde gefriergetrocknet und auf 1 mm vermahlen. Aus einem weiteren Teil wurde mit Hilfe einer Tinkturenpresse Presssaft gewonnen. Außer bei den Untersuchungen zur Presssaftcharakterisierung, bei der mit zwei unterschiedlichen Drücken gearbeitet wurde (60 und  $120 \text{ kp} \cdot \text{cm}^{-2}$ ), erfolgte die Pressung bei  $100 \text{ kp} \cdot \text{cm}^{-2}$  über eine Dauer von 2 Minuten.

Zur Bestimmung des Gär säuregehaltes wurden 50 g von ausgewählten Modellsilagen mit 200 ml destilliertem Wasser versetzt. Nach einer Nacht Kühltankschranklagerung wurde der Extrakt abfiltriert. Von den vier unsilierten TS-Stufen der Luzerne (Erntetermin 19.08.2004) im Rahmen der Untersuchungen zur Presssaftcharakterisierung wurden ebenfalls Extrakte in analoger Weise hergestellt.

#### 4.1.2 Chemisch-analytische Methoden

##### *Bestimmung der Trockensubstanz und der Rohasche*

In den Ausgangsmaterialien für die Presssaftgewinnung wurde der TS-Gehalt bestimmt, indem nach der Gefriertrocknung des unsilierten und silierten Pflanzenmaterials die



gemahlene lufttrockene Substanz bei 105°C für 3 h getrocknet wurde. Durch fünfstündige Veraschung des lufttrockenen Materials bei 600°C im Muffelofen erfolgte die Bestimmung der Rohasche. Die TS-Bestimmung des Presssaftes (PS) erfolgte durch Trocknung bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz (17,5 h).

#### *Bestimmung der Gerüstsubstanz*

Nach GOERING und VAN SOEST (1970) wurden die Gerüstsubstanzen Neutrale-Detergenzienfaser (NDF) und Säure-Detergenzienfaser (ADF) ermittelt.

#### *Bestimmung der Pufferkapazität*

Bei der Bestimmung der Pufferkapazität nach WEISSBACH (1967) wurde das lufttrockene gemahlene Probenmaterial zunächst mit destilliertem Wasser versetzt und 30 Minuten abgedeckt. Danach erfolgte die Messung der Menge an n/100 Milchsäure, die nötig war, um den pH-Wert auf 4,0 zu senken.

#### *Bestimmung der wasserlöslichen Kohlenhydrate*

Die Gehalte an wasserlöslichen Kohlenhydraten (WLK) wurden als mono- und dimere Kohlenhydrate im Kaltwasserextrakt über eine HPLC-Anlage unter Verwendung der Vorsäule (Micro-Guard Deashing, Biorad, USA) und einer Trennsäule (HPX87C, Biorad, USA) am Brechungsindexdetektor bestimmt. Dazu wurde ein Extrakt aus 2 g Probenmaterial (genaue Einwaageermittlung) mit 100 ml destilliertem Wasser und 20 mg HgCl<sub>2</sub> hergestellt, der 1 Stunde im Schüttelbad (SW 21, Julabo, Deutschland) mit einer Schüttelfrequenz von 150 R.P.M. bei Zimmertemperatur vor der Analyse verblieb.

#### *Bestimmung des pH-Wertes*

Die Messung der pH-Werte in Presssäften und Extrakten wurde mit der pH-Elektrode von WTW (pH-Meter pH 526, WTW, Weilheim, Deutschland) durchgeführt.

#### *Bestimmung der Osmolalität*

Die Bestimmung der Osmolalität im PS erfolgte nach HOEDTKE (2008) mit Hilfe des Gefrierpunktsmometers Osmomat 030 (Gonotec GmbH, Berlin, Deutschland).

#### *Bestimmung der Gärprodukte*

Mit der HPLC-Anlage Aminex HPX87H der Firma Shimadzu wurden die Milchsäuregehalte

und mit dem Gaschromatographen GC-14a die Gehalte an flüchtigen Fettsäuren und Alkoholen in den Extrakten bestimmt. In Tabelle 4.4 sind die Geräteparameter aufgeführt.

Tabelle 4.4: Geräteparameter der verwendeten HPLC und GC

<b>HPLC</b>	<b>Aminex HPX87H</b>
Flussmittel	10 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Flussrate	0,6 ml/min
Temperatur	60°C
Detektion	UV-Index bei 210 nm
<b>Gaschromatograph</b>	<b>GC-14a, CLASS-VP</b>
Säule	Permabond FFAP-DF-0.25, 25 m x 0,32 mm
Injektionsmenge	0,5 µl mit Splitt 1:50 bis 1:70
Injektionstemperatur	190°C
Ofentemperatur	1,5 min bei 110°C konst.; Aufheizphase: 12°C/min bis 170°C, 3 min konst. bei 170°C
Trägergas	N <sub>2</sub> reinst = 1 kp/cm <sup>2</sup> ; H <sub>2</sub> = 0,6 kp/cm <sup>2</sup> ; Luft = 0,5 kp/cm <sup>2</sup>
Detektor	Flammenionisationsdetektor, 190°C
Detektorintensität	10 <sup>1</sup>
Innere Standards	Isocaprinsäure für flüchtige Fettsäuren, n-Petanol für Alkohole

#### *Bestimmung der Tannine*

In der lufttrockenen Substanz des zur Herstellung der Mischsilagen verwendeten Hornklees wurden nach MAKKAR und GOODCHILD (1996) die Gesamtphenole, die Nicht-Tannin-Phenole und die kondensierten Tannine bestimmt. Die Tanninfraktionen Tannin-Phenole und hydrolysierbare Tannine ergaben sich durch Differenzbildung.

#### *Bestimmung des Gesamtstickstoffs*

In dem lufttrockenen gemahlenen Pflanzenmaterial (unsiliert und siliert) wurde der Gesamtstickstoff (Gesamt-N) nach DUMAS (SCHUSTER *et al.*, 1991) mit dem Macro-N-Analysator (Elementar Analysensysteme GmbH, Deutschland) bestimmt. Der Gesamt-N im PS wurde mit dem Kjeldatherm und dem Vapodest der Firma Gerhardt (Deutschland) anhand der Rohprotein-Bestimmung im KJELDAHL-Verfahren nach Lengerken und Zimmermann (1991) ermittelt.

#### *Bestimmung des Reinproteinstickstoffs*

Die Analyse des Reinproteinstickstoffs (Reinprotein-N) in dem lufttrockenen gemahlenen Pflanzenmaterial erfolgte nach GREENWALD (1915), wobei die abgefilterte in

Trichloressigsäure (TCE) unlösliche Substanz im KJELDAHL-Verfahren nach LENGERKEN und ZIMMERMANN (1991) bestimmt wurde.

#### *Bestimmung des $\alpha$ -Amino-Stickstoffs*

Die photometrische Bestimmung des  $\alpha$ -Amino-N im PS und Extrakt erfolgte nach ROSEN (1957) mit dem Spectronic Genesys 5 von Milton Roy (Frankreich), wobei eine Anpassung an die eigenen Bedingungen erfolgte.

#### *Bestimmung des Ammoniakstickstoffs*

Die Bestimmung des Ammoniakstickstoffs ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) im PS und Extrakt erfolgte nach der Conway-Methode in einer Modifikation von VOIGT und STEGER (1967) mit Mikrodiffusionsgefäßen.

#### 4.1.3 Modifikation des Rostocker Fermentationstests nach PIEPER *et al.* (1989) und ZIERENBERG (2000)

Die Untersuchung des Einflusses externer Faktoren (pH-Wert, Osmolalität, Temperatur, Milchsäurebakterien und Tannine) auf den Proteinabbau wurde auf Basis des Rostocker Fermentationstests (RFT) nach PIEPER *et al.* (1989) und ZIERENBERG (2000) durchgeführt. Das Grundprinzip des Tests ist die Herstellung von wässrigen Pflanzenaufgüssen, die inkubiert werden. Durch verschiedene Zusätze werden die Prozesse in der wässrigen Phase der Pflanzen direkt beeinflussbar. Dadurch ist es möglich, unter definierten Bedingungen die Wirkung der Einzelfaktoren sowie Kombinationen daraus zu untersuchen. Die wässrigen Pflanzenaufgüsse der Luzerne (Erntetermin 19.08.2004) mit unterschiedlichen Zusätzen ( $n=3$ ) wurden bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Die Beeinflussung des Proteinabbaus durch den pH-Wert (vergleichbar mit einer Säurezugabe als Siliermittelzusatz und/oder einer möglichst schnellen Ansäuerung im Silierprozess) wurde durch Einstellung bestimmter Anfangs-pH-Werte der Aufgüsse (0 h) mit konzentrierter Milchsäure untersucht. Neben einer unbehandelten Variante (0 h-pH-Wert 5,9) wurden pH-Werte von 4,8; 4,4; 4,2; 4,0; 3,8 und 3,6 eingestellt. Um den Einfluss der Osmolalität auf den Proteinabbau während der Fermentation zu überprüfen (vergleichbar mit dem Anwelken des Siliergutes), wurden neben Wasser verschieden konzentrierte KCl-Lösungen (2,36; 4,79; 7,22; 9,65; 12,08 und 14,51 %) zur Einstellung von 0,08 (in Wasser); 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5

und 3,0 osmol/kg in den Aufgüssen verwendet. Da Enzymaktivitäten stark durch die Temperatur beeinflusst werden können, wurden die Aufgüsse bei unterschiedlichen Temperaturen (20, 30, 40, 50 und 60°C) inkubiert. Zur Quantifizierung des Einflusses von Kombinationen aus erniedrigten pH-Werten in Verbindung mit einer erhöhten Osmolalität auf den Proteinabbau wurden Aufgüsse hergestellt, die zum einen mit zwei verschiedenen konzentrierten KCl-Lösungen (2,36 % = 0,5 osmol/kg und 9,65 % = 2,0 osmol/kg) und zum anderen mit konzentrierter Milchsäure zur Einstellung zweier Ausgangs-pH-Werte (4,4 und 4,0) versetzt wurden. Analoge Aufgüsse wurden zur Untersuchung des Einflusses aller Faktoren (pH-Wert, Osmolalität und Temperatur) auf den Proteinabbau zusätzlich bei 50°C inkubiert. Der Einfluss eines MSB-Präparats und dessen Einsatz mit Gärsubstratzusatz auf den Proteinabbau wurde durch Beimpfung der Aufgüsse mit  $3 \cdot 10^5$  KBE/g FM eines handelsüblichen MSB-Präparats (*Lactobacillus plantarum*) sowie in Kombination mit Zusatz von Zucker (2 % der FM) untersucht. Inwieweit sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe einen Einfluss ausüben, wurde durch Zusatz von Tanninen (Quebracho und Tanninsäure je 0,5; 1,5 und 2,5 % der FM) untersucht. Zur Abschätzung der Einzelwirkungen pflanzlicher und mikrobieller Enzymaktivitäten wurde Thiomersal als Mittel zur Unterdrückung der Mikroorganismen eingesetzt.

Die pH-Wert-Messungen erfolgten in den Aufgüssen nach einem vorgeschriebenem Zeitregime (0, 14, 18, 22, 26, 38 und 46 h). Nach 46-stündiger Inkubation wurde das Pflanzenmaterial mittels Faltenfiltern abgetrennt, die Extrakte wurden bei -20°C gelagert. Zur Beurteilung des Ausgangszustandes im Pflanzenmaterial, d.h. vor Inkubation, wurden Aufgüsse hergestellt, die nach 12 Stunden Aufbewahrung im Kühlschrank ebenfalls abfiltriert und bei -20°C gelagert wurden. In den Extrakten wurde zur Beurteilung des Proteinabbaus der  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt nach ROSEN (1957) bestimmt. In den Extrakten nach der Kühlschranklagerung wurde in mehreren separaten Ansätzen **0,086 mg  $\alpha$ -Amino-N/ml Extrakt** (n=10,  $\pm 0,004$  mg/ml) als konstanter  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt für die gehäckselte Luzerne (Erntetermin 19.08.2004) ermittelt (0h-Wert vor Inkubation).

#### 4.1.4 Festlegung der Bewertungskriterien für den Proteinabbau und die proteolytische Aktivität

Der Proteinabbau ist in der vorliegenden Arbeit als die Summe der Prozesse Proteolyse und Desmolyse definiert. Diese Prozesse führen hauptsächlich zur Erhöhung der freien

Aminosäuren resp. des Ammoniaks. Bei der photometrischen Bestimmung des  $\alpha$ -Amino-N mit Ninhydrin werden beide Fraktionen erfasst, so dass die Verwendung dieses Parameters zur Beurteilung des Ausmaßes des Proteinabbaus (als Summe) herangezogen wird. Weitere Abbauprodukte wie Amide und Amine reagieren entweder nicht mit Ninhydrin (Amide) oder nur in hohen Konzentrationen (Amine) (HARDING und MACLEAN, 1916), so dass nicht von einer Verfälschung der vorliegenden Ergebnisse ausgegangen wird. Zur Beurteilung der Prozesse Proteolyse und Desmolyse werden die Stickstofffraktionen

- freier Aminosäurenstickstoff (fr. AS-N) bzw.
- Ammoniakstickstoff ( $\text{NH}_3$ -N)

verwendet. Der Gehalt an freiem AS-N wird errechnet aus der Differenz des analysierten  $\alpha$ -Amino-N und  $\text{NH}_3$ -N. Diese Vorgehensweise wird durch Untersuchungen von WINTERS *et al.* (2002) gestützt, die zeigten, dass nach der Korrektur des  $\alpha$ -Amino-N-Gehaltes um den  $\text{NH}_3$ -N-Gehalt eine gute Annäherung an den Gehalt des freien Aminosäurenstickstoffs gelang, der vorher in ihren Untersuchungen mittels Ionenaustausch-Flüssigkeitschromatographie in den Silageextrakten analysiert wurde. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die ebenfalls bei der Proteolyse während des Silierprozesses potentiell entstehenden Peptide keine signifikante Einflussgröße bei der Bestimmung des  $\alpha$ -Amino-N sind. Tabelle 4.5 zeigt die zur Bearbeitung verschiedener Versuchsfragen verwendeten N-Fractionen.

Tabelle 4.5: Verwendete Stickstofffraktionen im Presssaft (PS) bzw. Extrakt zur Bearbeitung verschiedener Versuchsfragen

Stickstofffraktion	Dimension	Fragestellung
$\alpha$ -Amino-N	% der TSPS*	Charakterisierung der Presssaftzusammensetzung
$\text{NH}_3$ -N	% der TSPS	
$\alpha$ -Amino-N	mg/ml Extrakt	Beurteilung des Proteinabbaus unter in-vitro Bedingungen
$\alpha$ -Amino-N	mg freigesetzt aus der TPL**/g Gesamt-N im PS	Quantifizierung der proteolytischen Aktivität
freier Aminosäuren-N ( $\alpha$ -Amino-N – $\text{NH}_3$ -N)	% der TSPS und % des Gesamt-N im PS	Beurteilung der Proteolyse während der Silierung in Modellsilagen
$\text{NH}_3$ -N	% der TSPS und % des Gesamt-N im PS	Beurteilung der Desmolyse während der Silierung in Modellsilagen

\* Trockensubstanz des Presssaftes; \*\* Testproteinlösung

Die Charakterisierung des Presssaftes erfolgt in Abhängigkeit von zwei Abpressgraden und vom Zustand des Ausgangsmaterials (unsiliert und siliert) anhand der direkt im Presssaft analysierten Parameter  $\alpha$ -Amino-N und  $\text{NH}_3\text{-N}$ . Diese Untersuchungen sollen die Zusammensetzung des Presssaftes in Relation zum jeweiligen Ausgangsmaterial kennzeichnen. Die Prozesse Proteolyse und Desmolyse werden nicht beurteilt, so dass der Parameter freier Aminosäuren-N nicht errechnet wird.

Die proteolytische Aktivität ist das Potential eines enzymatisch aktiven Mediums, aus einer Testproteinlösung während einer unter definierten Bedingungen stattfindenden Inkubation  $\alpha$ -Amino-N freizusetzen. Vorversuche haben gezeigt, dass während der Inkubation der Ammoniakgehalt konstant blieb. Daraus wurde geschlussfolgert, dass ausschließlich proteolytische Vorgänge abliefen. Die Subtraktion des  $\text{NH}_3\text{-N}$ -Gehaltes von dem analysierten  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt zur Angabe der proteolytischen Aktivität mit dem Parameter freier Aminosäuren-N verändert damit die Aussage nicht. Da jedoch die Bestimmung des  $\text{NH}_3\text{-N}$  in allen Proben technisch zu aufwändig ist, wird korrekterweise der freigesetzte  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt zur Angabe der proteolytischen Aktivität verwendet.

Die Modellsilagen wurden angelegt, um die Prozesse Desmolyse und Proteolyse zu bewerten. Die Beurteilung dieser Prozesse erfolgt mit den Parametern freier Aminosäuren-N und  $\text{NH}_3\text{-N}$ . Im Gegensatz dazu wird mittels des modifizierten RFT die Beeinflussung des Proteinabbaus als Summe der beiden Prozesse unter in-vitro Bedingungen untersucht. Eine Analyse der  $\text{NH}_3\text{-N}$ -Gehalte in den Extrakten des modifizierten RFT erfolgte deshalb nicht.

#### 4.1.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS (Version 15.0; SPSS GmbH, Deutschland). In den Tabellen der vorliegenden Arbeit sind zumeist Mittelwerte und Standardabweichungen ( $\pm s$ ) angegeben und signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten mit  $p < 0,05$  durch Klein- bzw. Großbuchstaben gekennzeichnet. Paarweise Mittelwertvergleiche wurden mittels t-Test nach Student durchgeführt. Die Prüfung der Varianzhomogenität erfolgte dabei mit dem Levene-Test. Für den Vergleich von mehr als zwei Stichproben wurde eine einfaktorielle ANOVA angewendet. Bei vorliegender Varianzhomogenität wurden die Differenzen der Mittelwerte der Parameter nach dem Duncan-Test auf Signifikanz geprüft. Daten, für die keine Varianzhomogenität vorlag, wurden mittels Dunnett-T3-Test auf signifikante Unterschiede der Mittelwerte untersucht.

Beziehungen zwischen Parametern wurden über Regressionsanalysen mit Angabe der Regressionsgleichung, des Bestimmtheitsmaßes ( $R^2$ ) und des Standardfehlers der Gleichung ( $s$ ) für die Signifikanzniveaus  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$  und  $p < 0,05$  ausgewiesen.

## 4.2 Ergebnisse

### 4.2.1 Konzeption einer in-vitro Methode zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität

#### 4.2.1.1 Auswahl des Messkriteriums

Als Messkriterien zur Quantifizierung der proteolytischen Aktivität kommen vor allem die Verminderung des Reinproteingehaltes und die Erhöhung des Gehaltes der Abbauprodukte, im Besonderen der  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt, in Betracht. In Tabelle 4.6 sind die Gehalte beider N-Fractionen vor und nach Inkubation im Presssaft von Luzerne angegeben.

Tabelle 4.6: Reinprotein-N- und  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt von Presssaft (PS) aus Luzerne vor und nach einer Inkubation (Ink.) von 24 h bei 40°C (n=6)

Presssaft aus	mg Reinprotein-N/ml PS		mg $\alpha$ -Amino-N/ml PS	
	vor Ink.	nach Ink.	vor Ink.	nach Ink.
Luzerne	0,300 $\pm$ 0,062	0,188 $\pm$ 0,025	0,563 $\pm$ 0,007	0,662 $\pm$ 0,006

Die Bestimmung des  $\alpha$ -Amino-N-Gehaltes erwies sich als schnell, reproduzierbar und für die Bearbeitung größerer Probenmengen geeignet. Dies wird auch von MCKERSIE (1985) hervorgehoben. Die Reinprotein-N-Bestimmung ist dagegen aufwändig und liefert nicht bei allen Substraten gleich gute Ergebnisse. Darüber hinaus wird sie von vielen Fehlerquellen beeinflusst. Ein Indiz dafür ist der relative Variationskoeffizient ( $v = s \cdot \text{Mittelwert}^{-1} \cdot 100 \%$ ), der bei der Bestimmung des  $\alpha$ -Amino-N-Gehaltes mit 1,2 % vor und 0,9 % nach der Inkubation deutlich niedriger war als der bei der Bestimmung des Reinprotein-N-Gehaltes (20,7 % vor und 13,3 % nach der Inkubation). Durch die Inkubation verringert sich der Gehalt des Reinprotein-N um 37,3 % während der  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt nur um 17,5 % ansteigt. Absolut wurden 0,112 mg Reinprotein-N je ml Presssaft während der Inkubation hydrolysiert. Der Anstieg des  $\alpha$ -Amino-N-Gehaltes erfolgte um 0,099 mg je ml PS. Es ist davon auszugehen, dass Proteinbruchstücke entstanden sind, die mit der  $\alpha$ -Amino-N-Bestimmung nicht erfasst wurden. Diese mögliche Unterschätzung der Proteinhydrolyse bei der Verwendung von  $\alpha$ -Amino-N als Messkriterium der proteolytischen Aktivität wurde bereits von BRADY (1961) und MCKERSIE (1985) beschrieben und auf die Bildung von Peptiden zurückgeführt, die nicht erfasst werden. Bei der Anwendung der konzipierten in-vitro Methode ist aus Sicht der Beurteilung des möglichen Ausmaßes des während der Silierung stattfindenden Proteinabbaus vor allem die Bildung der  $\alpha$ -Amino-N-Verbindungen als kritisch

anzusehen. Da die Peptidbildung aus Sicht der Ernährung der landwirtschaftlichen Nutztiere nicht negativ bewertet wird (CRUZ SOTO *et al.*, 1994), ist die Aussagekraft der proteolytischen Aktivität auf Basis des  $\alpha$ -Amino-N-Gehaltes als Kriterium ausreichend. Darüber hinaus haben Vorversuche gezeigt, dass sich der  $\text{NH}_3$ -N-Gehalt in den Inkubationsmedien bei den verwendeten Inkubationsbedingungen nicht veränderte, was auf ausschließlich proteolytische Enzymaktivitäten zurückgeführt wurde. Daher wird die Aussage durch eventuelle Korrektur des  $\alpha$ -Amino-N-Gehaltes um den  $\text{NH}_3$ -N-Gehalt nicht verändert. Um die technische Vorgehensweise bei der Anwendung der Methode zu vereinfachen, kann daher auf die Bestimmung des  $\text{NH}_3$ -N-Gehaltes in allen Inkubationsmedien verzichtet werden. Korrekterweise wird jedoch der analysierte  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt als geeignetes Messkriterium für die proteolytische Aktivität verwendet.

Die proteolytische Aktivität ist das Potential eines enzymatisch aktiven Mediums,  $\alpha$ -Amino-N durch hydrolytische Spaltung von Proteinen oder Peptiden freizusetzen. Da das Potential unabhängig vom tatsächlichen Angebot an spaltbarem Substrat beurteilt wird, muss folglich das Substrat im Überschuss vorhanden sein, um nicht limitierend zu wirken.

Aus dieser Definition leitet sich das Prinzip der in-vitro Methode ab:

Ein enzymatisch aktives Medium (Presssaft) wirkt auf ein Testproteinpräparat ein. Dadurch wird sichergestellt, dass das Substrat nicht in Mangel gerät und dass eine Vergleichbarkeit der proteolytischen Aktivitäten unterschiedlicher Presssäfte geschaffen wird.

Die proteolytische Aktivität von Pflanzenpresssäften ist dabei eine summarische Größe, denn in den Presssäften sind sowohl pflanzliche als auch mikrobielle Enzyme enthalten.

#### 4.2.1.2 Wahl des Testproteinpräparates

Das Testproteinpräparat muss folgende Voraussetzungen erfüllen:

- möglichst hoher N-Gehalt ohne Verunreinigungen,
- möglichst geringer Gehalt an  $\alpha$ -Amino-N nach Fällung mit TCE,
- keine eigene oder nur sehr geringe proteolytische Aktivität, d.h. die alleinige Inkubation des Proteinpräparates sollte zu keiner bzw. nur zu geringer Bildung von  $\alpha$ -Amino-N führen.

Unter diesen Gesichtspunkten wurden insgesamt 9 kommerziell erhältliche Proteinpräparate untersucht. In Tabelle 4.7 sind die Stickstoffgehalte der Proteinpräparate dargestellt.



Tabelle 4.7: Testproteinpräparate (Hersteller und Stickstoffgehalt in % d. Originalsubstanz (OS))

Hersteller	Proteinpräparate	N-Gehalt [% d. OS]
Sifin (Berlin):	Erbsenhydrolysat	13,6
	Sojamehlpepton	9,9
	Weizenmehlpepton	12,8
	Vegetarisches Pepton Martone B-1	9,7
	Vegetarisches Pepton Freetone A-1	12,9
Merck:	Bovines Serumalbumin (BSA)	15,3
	Gelatine	16,1
Georg Breuer GmbH:	Prolu 900 (Lupinenprotein)	13,4
	Pisane (Erbsenprotein)	13,0

Der N-Gehalt war in den Präparaten Erbsenhydrolysat, BSA, Gelatine, Prolu 900 und Pisane am höchsten. Die  $\alpha$ -Amino-N-Gehalte der Testproteinpräparate vor und nach einer 24-stündigen Inkubation bei 50°C (1 g Proteinpräparat in 40 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung mit 10 ml 15 %iger TCE gefällt) werden in Tabelle 4.8 wiedergegeben.

Tabelle 4.8:  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt der Proteinpräparatlösungen vor und nach Inkubation (n=3)

Proteinpräparat	mg $\alpha$ -Amino-N / ml Filtrat		Erhöhung des $\alpha$ -Amino-N	
	vor Inkubation	nach Inkubation	absolut [mg/ml]	relativ [%]
Erbsenhydrolysat	0,114 $\pm$ 0,000	0,113 $\pm$ 0,002	-0,001	-1
Sojamehlpepton	0,112 $\pm$ 0,001	0,112 $\pm$ 0,004	-0,001	-1
Weizenmehlpepton	0,097 $\pm$ 0,001	0,387 $\pm$ 0,040	0,290	299
Martone B-1	0,061 $\pm$ 0,001	0,661 $\pm$ 0,107	0,600	984
Freetone A-1	0,095 $\pm$ 0,001	0,510 $\pm$ 0,015	0,415	437
BSA	<b>0,008</b> $\pm$ 0,000	0,009 $\pm$ 0,000	0,001	<b>12</b>
Gelatine	<b>0,052</b> $\pm$ 0,004	0,101 $\pm$ 0,003	0,049	<b>94</b>
Prolu	<b>0,013</b> $\pm$ 0,000	0,013 $\pm$ 0,001	0,000	<b>0</b>
Pisane	<b>0,021</b> $\pm$ 0,001	0,022 $\pm$ 0,001	0,001	<b>5</b>

Danach erfüllten BSA, Gelatine, Prolu 900 und Pisane die gestellten Vorgaben. Alle anderen Proteinpräparate wiesen entweder trotz geringer proteolytischer Aktivitäten hohe Gehalte an  $\alpha$ -Amino-N auf (Erbsenhydrolysat und Sojamehlpepton) oder bei nur geringen  $\alpha$ -Amino-N-Gehalten hohe proteolytische Aktivitäten (z.B. Martone B-1). Prolu 900 und Gelatine wurden wegen schlechter Löslichkeit in weiteren Untersuchungen nicht verwendet. Um zu überprüfen, inwieweit der Reinprotein-N der Testproteinpräparate durch die im PS enthaltenen Enzyme hydrolysiert wurde, d.h. der Anstieg des  $\alpha$ -Amino-N-Gehaltes im PS

nach Inkubation aus der Hydrolyse des Reinproteins resultierte, wurde Luzerne-PS mit BSA und Pisane inkubiert. Als Modelllösung für einen PS ohne PA diente eine 0,9 %ige NaCl-Lösung. In Tabelle 4.9 sind die Reinprotein-N-Gehalte nach Inkubation (24 h bei 40°C) dargestellt.

Tabelle 4.9: Einfluss der proteolytischen Aktivität (PA) von Luzernepresssaft (Luzerne-PS) im Vergleich zu einer Modelllösung ohne PA (0,9 %ige NaCl-Lsg.) auf den Reinprotein-N-Gehalt verschiedener Proteinpräparate nach Inkubation (n=3)

mg Reinprotein-N/ml nach Inkubation					
Zusatz	analysierter Gehalt			kalkulierter Gehalt*	Abbau **
	Luzerne-PS	Modelllösung			
ohne	0,19	±0,02	0		
BSA	14,90	±0,16	14,75	±0,07	<b>14,94</b> <b>0,04</b>
Pisane	9,29	±0,33	12,48	±0,42	<b>12,67</b> <b>3,38</b>

\* Addition von dem analysierten Gehalt im Luzerne-PS ohne Zusatz mit dem analysierten Gehalt der Modelllösung mit Proteinpräparat (Unterstellung, dass Enzyme des PS nicht auf zugesetztes Proteinpräparat einwirken)

\*\* kalkulierter Gehalt – Gehalt im Luzerne-PS nach Inkubation mit Proteinpräparat

Nach diesem Inkubationsschema gab es zwei Reinprotein-N-Gehalte, die zur Beurteilung des Abbaus herangezogen wurden. Zum einen war dies der analysierte Reinprotein-N-Gehalt, der nach der Inkubation des PS mit dem Proteinpräparat, d.h. mit enzymatischem Einfluss des PS auf das Proteinpräparat, gemessen wurde (14,90 mg/ml mit BSA; 9,29 mg/ml mit Pisane). Zum anderen erfolgte die Kalkulation des Reinprotein-N-Gehaltes nach Inkubation des PS mit dem Proteinpräparat mit der Unterstellung, dass keine enzymatische Wirkung des PS auf das Proteinpräparat stattgefunden hat. Dafür wurde der Gehalt des PS bei alleiniger Inkubation und der bei der Inkubation der Modelllösung mit dem Proteinpräparat addiert (0,19 mg/ml + 14,75 mg/ml (BSA) oder + 12,48 mg/ml (Pisane)). Durch Subtraktion des kalkulierten Reinprotein-N-Gehaltes um den analysierten Reinprotein-N-Gehalt ergab sich der Abbau des Reinprotein-N-Gehaltes des Proteinpräparates durch die enzymatische Aktivität des PS (0,04 mg/ml bei BSA; 3,38 mg/ml bei Pisane). Demzufolge wurde der Reinprotein-N des BSA durch die Enzyme des Luzerne-PS nur in sehr geringem Maß abgebaut. Die Enzyme des Luzerne-PS konnten den Reinprotein-N des pflanzlichen Proteinpräparates (Pisane) besser hydrolysieren als den Reinprotein-N aus tierischer Herkunft (BSA). Daher wurde **Pisane** als Testproteinpräparat ausgewählt und in den weiteren

Untersuchungen eingesetzt. Eine Charakterisierung von Pisane (Herstellerangaben) ist im Anhang B angegeben.

#### 4.2.1.3 Bestimmung der Eigenproteolyse des Presssaftes und der Testproteinlösung, der Gesamtproteolyse und der proteolytischen Aktivität (Testschema)

Das Testschema der konzipierten in-vitro Methode ist in Abbildung 4.1 zu erkennen.

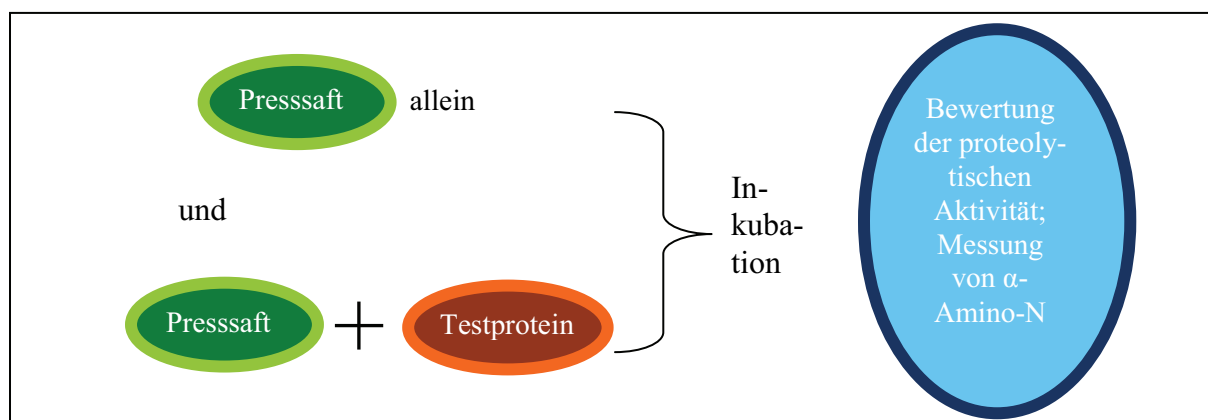


Abbildung 4.1: Schema der in-vitro Methode zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität

Zur Erläuterung der Vorgehensweise bei der in-vitro Bestimmung der proteolytischen Aktivität wurde mit Luzernepresssäften wie folgt verfahren. Da sich in Voruntersuchungen gezeigt hatte, dass sich der  $\text{NH}_3\text{-N}$ -Gehalt in den Inkubationsmedien nicht veränderte, wurde im Folgenden die Erhöhung des  $\alpha$ -Amino-N-Gehaltes auf proteolytische Prozesse zurückgeführt.

Es wurden drei unterschiedliche Ansätze zur Bestimmung der Proteolyse (PL) hergestellt:

- I:** PS mit 0,9 %iger NaCl-Lösung zur Bestimmung der **Eigenproteolyse des PS**  
gemessen wurde **freigesetzter  $\alpha$ -Amino-N durch Eigenproteolyse ( $\text{PL}_{\text{eigenPS}}$ )**
- II:** PS mit Testproteinlösung (TPL) zur Bestimmung der **Gesamtproteolyse (PS und TPL)**  
(1,5 % Erbsenprotein Pisane in 0,9 %iger NaCl-Lösung)  
gemessen wurde **freigesetzter  $\alpha$ -Amino-N durch Gesamtproteolyse ( $\text{PL}_{\text{ges}}$ )**
- III:** 0,9 %ige NaCl-Lösung als Modelllösung für einen Presssaft ohne proteolytische Aktivität mit TPL zur Bestimmung der **Eigenproteolyse der TPL** als Korrekturwert bei der Berechnung der proteolytischen Aktivität  
gemessen wurde **freigesetzter  $\alpha$ -Amino-N durch Eigenproteolyse der TPL ( $\text{PL}_{\text{eigenTPL}}$ )**

Es folgte eine 24-stündige Inkubation aller Varianten (I, II und III) bei 40°C. Nach der Inkubation wurde das nicht hydrolysierte Protein mit 15 %iger Trichloressigsäure gefällt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, im Filtrat wurde die Bestimmung des  $\alpha$ -Amino-N nach ROSEN (1957) vorgenommen. Die **proteolytische Aktivität (PA)** des Luzernepresssaftes wurde mit den ermittelten Gehalten an  $\alpha$ -Amino-N wie folgt berechnet:

$$\text{PA [mg freigesetzter } \alpha\text{-Amino-N aus der TPL} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ PS]} = \text{PL}_{\text{ges}} \text{ (II)} - \text{PL}_{\text{eigenPS}} \text{ (I)} - \text{PL}_{\text{eigenTPL}} \text{ (III)}.$$

Nach der Inkubation der TPL (**Var. III**) wurde nur eine geringe Menge  $\alpha$ -Amino-N im Filtrat nachgewiesen (Tabelle 4.10).

Um die Genauigkeit der in-vitro Methode zu überprüfen, wurde ein Luzernepresssaft in sieben Wiederholungen gemessen (Tabelle 4.11).

Tabelle 4.10: Eigenproteolyse ( $\text{PL}_{\text{eigenTPL}}$ ) der Testproteinlösung (TPL) nach Inkubation mit Modelllösung (NaCl) bei 40°C

$\text{PL}_{\text{eigenTPL}}$	mg $\alpha$ -Amino-N/ml NaCl
Mittelwert (n=4)	0,067
$\pm s$	0,003

Tabelle 4.11: Gesamtproteolyse ( $\text{PL}_{\text{ges}}$ = Inkubation PS mit TPL) und Eigenproteolyse des PS ( $\text{PL}_{\text{eigenPS}}$ ) nach Inkubation bei 40°C

	mg $\alpha$ -Amino-N/ml PS	
	$\text{PL}_{\text{ges}}$	$\text{PL}_{\text{eigenPS}}$
Mittelwert (n=7)	1,120	0,612
$\pm s$	0,013	0,017

Die gemessene  $\text{PL}_{\text{ges}}$  betrug etwa das Doppelte der  $\text{PL}_{\text{eigenPS}}$ . Da der  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt der TPL nach der Inkubation gering war, kann dieser Unterschied auf die proteolytische Aktivität des PS zurückgeführt werden.

Die Genauigkeit der Berechnung der proteolytischen Aktivität wurde mit sieben Luzerne-PS ermittelt, die wie zuvor beschrieben behandelt wurden.

Nach der Inkubation dieser **sieben** Presssäfte (je 3 Parallelen) wurden

$$\text{PL}_{\text{eigenPS}} = \mathbf{0,661} (\pm 0,040) \text{ und}$$

$$\text{PL}_{\text{ges}} = \mathbf{1,145} (\pm 0,031) \text{ mg } \alpha\text{-Amino-N/ml PS gemessen.}$$

Mit

$$\text{PL}_{\text{eigenTPL}} = \mathbf{0,067} (\pm 0,003) \text{ mg } \alpha\text{-Amino-N/ml Modelllösung}$$

resultiert demnach eine mittlere proteolytische Aktivität des Luzernepresssaftes von:

$$\text{PA [mg freigesetzter } \alpha\text{-Amino-N aus der TPL/ml PS]} = \mathbf{0,417} (\pm 0,042).$$

Es konnten folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

- Die TPL wies einen stabilen und im Vergleich zu den gemessenen Gehalten in Luzerne-PS geringen  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt nach der Inkubation auf.
- Die proteolytischen Enzyme im PS waren wiederholbar in der Lage,  $\alpha$ -Amino-N aus der TPL freizusetzen, wodurch die proteolytische Aktivität quantifizierbar wurde.
- Die Variation der ermittelten proteolytischen Aktivität betrug 10 %.
- Durch die Verwendung einer einheitlichen TPL wird es möglich sein, die proteolytischen Aktivitäten von PS unterschiedlicher Pflanzen in verschiedenen Vegetationsstadien und Konservierungsformen zu vergleichen.

#### 4.2.1.4 Presssaft als Substrat zur Quantifizierung des Proteinabbaus und der proteolytischen Aktivität in Grünfütterleguminosen und deren Silagen

Die Verwendung des Presssaftes als Substrat für das jeweilige Grünfütter oder Konservat zur Quantifizierung des Proteinabbaus und der proteolytischen Aktivität setzt eine Charakterisierung des Presssaftes in Relation zum Ausgangsmaterial für die Presssaftgewinnung unter verschiedenen Bedingungen voraus.

##### 4.2.1.4.1 Mengenanteile und TS-Gehalte

In Tabelle 4.12 ist das Verhältnis von Presssaft (PS) und Presskuchen (PKu) unter dem Einfluss des Anwelkens und der Anwendung unterschiedlicher Pressdrücke dargestellt. Folgende Kennzeichnung der Anwelkstufen und deren Modellsilagen wurde verwendet:

F	unsilierte Luzerne Frisch	SF	siliert aus Luzerne Frisch
A1	unsilierte Luzerne Anwelkstufe 1	SA1	siliert aus Luzerne Anwelkstufe 1
A2	unsilierte Luzerne Anwelkstufe 2	SA2	siliert aus Luzerne Anwelkstufe 2
A3	unsilierte Luzerne Anwelkstufe 3	SA3	siliert aus Luzerne Anwelkstufe 3

Tabelle 4.12: Charakterisierung von Presssaft (PS) und Presskuchen (PKu) je kg Ausgangsmaterial (unsilierte und silierte Luzerne) in Abhängigkeit vom Anwelkgrad und dem Pressdruck

a) Unsilierte Luzerne (n=3)

Anwelkstufe	TS [%]	Druck [kp/cm <sup>2</sup> ]	PS [g]	TSPS [%]	PKu [g]	PS + PKu [g]	Differenz [g]	Anteil des PS am Gesamt-H <sub>2</sub> O [%]
F	17,93 ± 0,18	60	595,34 ± 19,56	B	385,68 ± 19,93	981,02 ± 0,72	18,98 ± 0,72	72,5
		120	626,78 ± 3,55		353,36 ± 4,81	980,13 ± 3,35	19,87 ± 3,35	76,4
A1	25,11 ± 0,38	60	<sup>b</sup> 442,25 ± 11,09	B	539,84 ± 16,50	982,09 ± 7,86	17,91 ± 7,86	59,1
		120	<sup>a</sup> 475,64 ± 12,67		505,78 ± 12,72	981,43 ± 1,15	18,58 ± 1,15	63,5
A2	32,38 ± 0,36	60	<sup>b</sup> 294,04 ± 10,91	B	688,53 ± 11,37	982,58 ± 1,77	17,42 ± 1,77	43,5
		120	<sup>a</sup> 314,22 ± 3,89		667,94 ± 5,24	982,16 ± 1,44	17,84 ± 1,44	46,5
A3	41,74 ± 0,32	60	126,00 ± 3,22	B	860,91 ± 6,00	986,91 ± 3,38	13,09 ± 3,38	21,6
		120	135,29 ± 7,53		851,54 ± 8,22	986,83 ± 0,68	13,17 ± 0,68	23,2

b) Silierte Luzerne (n=3)

Anwelkstufe	TS [%]	Druck [kp/cm <sup>2</sup> ]	PS [g]	TSPS [%]	PKu [g]	PS + PKu [g]	Differenz [g]	Anteil des PS am Gesamt-H <sub>2</sub> O [%]
SF	17,47 ± 0,89	60	612,34 ± 15,07	A	374,55 ± 16,62	986,89 ± 1,55	13,11 ± 1,55	74,2
		120	652,64 ± 20,99		335,39 ± 22,67	988,03 ± 2,50	11,97 ± 2,50	79,1
SA1	23,24 ± 0,24	60	<sup>b</sup> 494,39 ± 0,64	A	493,32 ± 1,86	987,71 ± 1,32	12,29 ± 1,32	64,4
		120	<sup>a</sup> 530,17 ± 18,99		459,32 ± 17,63	989,48 ± 1,47	10,52 ± 1,47	69,1
SA2	30,71 ± 0,43	60	<sup>b</sup> 348,33 ± 8,57	A	639,04 ± 9,04	987,37 ± 1,73	12,63 ± 1,73	50,3
		120	<sup>a</sup> 387,76 ± 21,50		600,50 ± 20,66	988,26 ± 2,14	11,74 ± 2,14	56,0
SA3	38,92 ± 0,29	60	240,10 ± 5,31	A	749,99 ± 7,02	990,09 ± 1,83	9,91 ± 1,83	39,3
		120	260,30 ± 11,58		732,14 ± 10,61	992,44 ± 1,06	7,56 ± 1,06	42,6

<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben innerhalb einer Anwelkstufe bedeuten signifikante Unterschiede zwischen den Druckstufen für p<0,05

<sup>A,B</sup> Unterschiedliche Großbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede zwischen Parametern unsilierter und silierteter gleicher Anwelkstufen für p<0,05 (Druckstufen zusammengefasst)

Die Auswertung der Presssaftmengen aus unsilierter Luzerne (Tabelle 4.12a) zeigte, dass durch den höheren Pressdruck ( $120 \text{ kp}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) tendenziell mehr PS (g je kg FM) gewonnen werden konnte. Dabei war der Unterschied bei den Anwelkstufen A1 und A2 statistisch gesichert. Beim Vergleich der unterschiedlich gewonnenen PS-Mengen aller unsiliierten Anwelkstufen wurde jedoch kein Unterschied zwischen den Pressdrücken festgestellt. Die TS-Gehalte des PS waren innerhalb der Anwelkstufen nicht signifikant unterschiedlich.

Die Presssaftmengen der mit unterschiedlichen Anwelkstufen silierten Luzerne verhielten sich analog, d.h. tendenziell höhere Mengen bei  $120 \text{ kp}\cdot\text{cm}^{-2}$ , dabei gesichert höher bei SA1 und SA2. Der Vergleich der Presssaftmengen aller silierten Anwelkstufen (SF bis SA3) zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen 60 und  $120 \text{ kp}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Die TS-Gehalte des PS aus den Modellsilagen waren ebenfalls innerhalb der Anwelkstufen nicht signifikant unterschiedlich.

Beim Vergleich aller PS-Mengen und aller TS-Gehalte des PS (unsiliert und siliert, alle Anwelkstufen) waren keine signifikanten Unterschiede durch unterschiedliche Pressdrücke zu verzeichnen.

Durch den Gärprozess erhöhte sich die abpressbare PS-Menge. Es bestanden außer bei der frischen Luzerne (nur tendenziell mehr PS im silierten Material SF als im unsiliierten F) signifikante Unterschiede zwischen der PS-Menge aus unsilierter verglichen mit siliierter Luzerne in der jeweiligen Anwelkstufe (sowohl bei 60 als auch bei  $120 \text{ kp}\cdot\text{cm}^{-2}$ , deshalb erfolgte eine zusammengefasste Auswertung). Bei den TS-Gehalten des PS der jeweiligen Anwelkstufe waren die aus siliertem Material ebenfalls höher, wobei diese Tendenz bei  $F < SF$  und  $A2 < SA2$  statistisch gesichert war.

Bei der Addition der Menge des nach der Pressung zurückbleibenden Presskuchens (PKu) mit der des entsprechenden PS ergaben sich Differenzen zum ursprünglich eingesetzten Pflanzenmaterial für die Presssaftgewinnung von 0,7 bis 2,0 %, welche auf Verluste beim Pressvorgang zurückgeführt wurden.

Erwartungsgemäß nahm mit zunehmendem Anwelkgrad der Anteil der auspressbaren PS-Menge am Gesamtpflanzen- $\text{H}_2\text{O}$  ab, dabei stärker im unsiliierten Material (von 76 auf 22 %) als im silierten Material (von 79 auf 39 %). Der Einfluss des TS-Gehaltes des Ausgangsmaterials (x in g TS/kg FM) auf die gewonnene Presssaftmenge (y in g PS/kg FM) lässt sich in folgenden linearen Regressionsgleichungen angeben:

$$\text{unsiliert: } y = 968^{***} - 2,02^{***} \cdot x \quad R^2=0,99 \quad s\pm 18,8 \quad p<0,001 \quad (n=24) \quad (\text{G } 1)$$

$$\pm 13,3 \quad \pm 0,04$$

$$\text{siliert: } y = 933^{***} - 1,79^{***} \cdot x \quad R^2=0,97 \quad s\pm 25,7 \quad p<0,001 \quad (n=24) \quad (\text{G } 2)$$

$$\pm 18,7 \quad \pm 0,06$$

Erhöht sich der TS-Gehalt des Pflanzenmaterials um 10 %, werden demnach 200 g weniger Presssaft je kg unsiliertem und 180 g je kg siliertem Ausgangsmaterial gewonnen. Mit steigendem TS-Gehalt des Pflanzenmaterials nimmt auch der TS-Gehalt des Presssaftes zu (Abbildung 4.2).

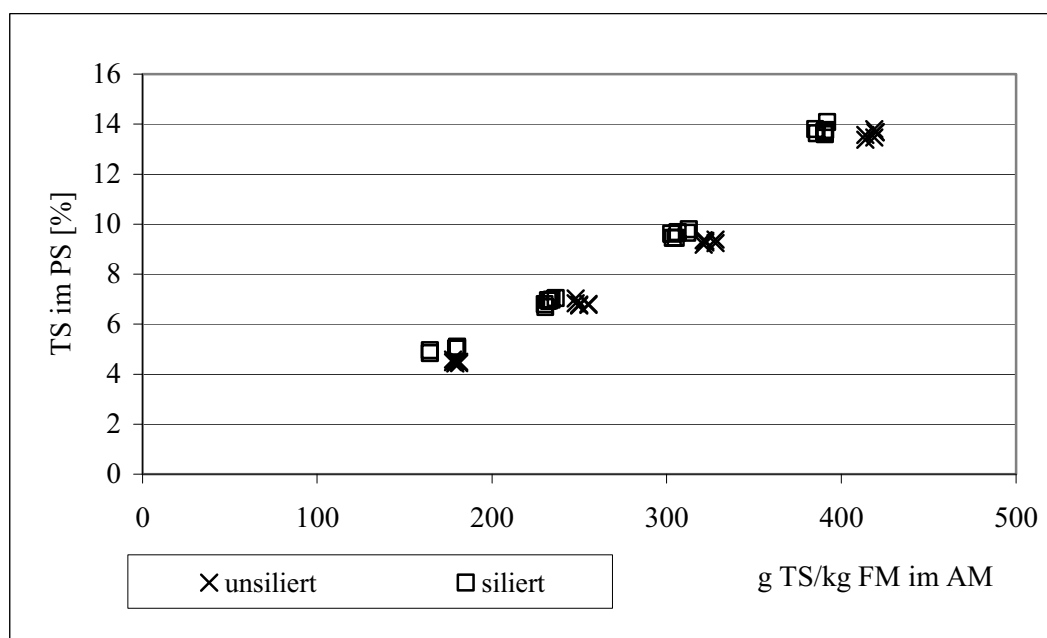


Abbildung 4.2: Abhängigkeit des TS-Gehaltes des Presssaftes (PS) vom TS-Gehalt des Ausgangsmaterials (AM) bei unsilierter und siliert Luzerne

Der Einfluss des TS-Gehaltes des Ausgangsmaterials für die Presssaftgewinnung ( $x$  in g TS/kg FM) auf den TS-Gehalt der Presssäfte ( $y$  in %) wurde mit folgender exponentieller Regression signifikant beschrieben:

$$\text{unsiliert: } y = 2,06^{***} \cdot e^{0,005^{***} \cdot x} \quad R^2=0,99 \quad s \pm 0,04 \quad p < 0,001 \quad (n=24) \quad (G \ 3)$$

$\pm 0,06 \quad \pm 0,000$

$$\text{siliert: } y = 2,26^{***} \cdot e^{0,005^{***} \cdot x} \quad R^2=1,00 \quad s \pm 0,03 \quad p < 0,001 \quad (n=24) \quad (G \ 4)$$

$\pm 0,04 \quad \pm 0,000$

Tendenziell deutete sich ein höherer Einfluss der TS-Gehalte des silierten Ausgangsmaterials für die Presssaftgewinnung im Vergleich zum unsilierten an, d.h. bei identischem TS-Gehalt des Ausgangsmaterials ist der TS-Gehalt des Presssaftes aus dem silierten Material höher.

Trotz des steigenden TS-Gehaltes der Presssäfte mit zunehmendem Anwelkgrad nahmen relativ zu der absoluten TS-Menge aus 1 kg des jeweiligen Ausgangsmaterials für die Presssaftgewinnung die Massenanteile der mit dem Presssaft aus der Luzerne entfernten TS ab. Die Beziehung zwischen dem Anteil der absoluten TS-Menge des Presssaftes an der TS-



Menge in einem kg Ausgangsmaterial (y in %) und der TS-Menge des Ausgangsmaterials (x in g TS/kg FM) kann folgendermaßen formuliert werden:

$$\text{unsiliert: } y = 23,9^{***} - 0,05^{***} \cdot x \quad R^2=0,99 \quad s \pm 0,45 \quad p < 0,001 \quad (n=24) \quad (\text{G } 5)$$

$$\pm 0,3 \quad \pm 0,00$$

$$\text{siliert: } y = 25,5^{***} - 0,04^{***} \cdot x \quad R^2=0,96 \quad s \pm 0,79 \quad p < 0,001 \quad (n=24) \quad (\text{G } 6)$$

$$\pm 0,6 \quad \pm 0,00$$

Bei einem 10 %igen Trockensubstanzanstieg des Pflanzenmaterials geht der Anteil der TS-Menge an der TS-Menge des Ausgangsmaterials um 5 % bei der unsilierten und um 4 % bei der silierten Luzerne zurück.

#### 4.2.1.4.2 Stickstofffraktionen im Presssaft und im Presskuchen

Die Beeinflussung des Proteinabbaus als Prozess durch das Anwelken und die Fermentation im Silo wurde anhand der Veränderungen von ausgewählten N-Fraktionen in verschiedenen Medien (Ausgangsmaterial für die Presssaftgewinnung, Presskuchen, Presssaft) beurteilt.

In Tabelle 4.13 sind die analysierten N-Fraktionen in den unsilierten und silierten Ausgangsmaterialien für die Presssaftgewinnung angegeben.

Tabelle 4.13: Veränderung ausgewählter N-Fraktionen im Ausgangsmaterial bei unsilierter Luzerne (a) und silierten (48 d) Luzerne (b) unter dem Einfluss des Anwelkens (n=3)

(a) Luzerne		N-Fraktionen [% der TS]		
	Gesamt-N	Reinprotein-N	$\alpha$ -Amino-N	NH <sub>3</sub> -N
unsiliert	F	2,54 ± 0,09	1,79 ± 0,03	<sup>b</sup> 0,24 ± 0,03
	A1	2,49 ± 0,01	1,71 ± 0,03	<sup>ab</sup> 0,26 ± 0,01
	A2	2,49 ± 0,01	1,74 ± 0,02	<sup>ab</sup> 0,25 ± 0,00
	A3	2,52 ± 0,21	1,75 ± 0,07	<sup>a</sup> 0,27 ± 0,01
(b) Luzerne		N-Fraktionen [% der TS]		
	Gesamt-N	Reinprotein-N	$\alpha$ -Amino-N	NH <sub>3</sub> -N
siliert	SF	<sup>B</sup> 2,39 ± 0,05	<sup>C</sup> 1,34 ± 0,03	<sup>A</sup> 0,83 ± 0,13
	SA1	<sup>A</sup> 2,58 ± 0,04	<sup>B</sup> 1,47 ± 0,07	<sup>A</sup> 0,82 ± 0,08
	SA2	<sup>A</sup> 2,65 ± 0,08	<sup>A</sup> 1,60 ± 0,08	<sup>B</sup> 0,65 ± 0,08
	SA3	<sup>A</sup> 2,63 ± 0,04	<sup>A</sup> 1,57 ± 0,05	<sup>C</sup> 0,48 ± 0,01

<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte bei unsilierter Luzerne für p<0,05

<sup>A,B</sup> Unterschiedliche Großbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte bei silierten Luzerne für p<0,05

Durch das Anwelken wurden weder der Gesamt-N-Gehalt noch der Reinprotein-N-Gehalt bezogen auf die TS der unsilierten Luzerne verändert. Der  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt und der  $\text{NH}_3$ -N-Gehalt stiegen während des Anwelkens leicht an, wobei sich jeweils nur die Gehalte der frischen Luzerne (F) von der am stärksten angewelkten (A3) signifikant unterschieden.

Die aus unterschiedlich angewelkter Luzerne hergestellten Silagen wiesen im Vergleich zu den Silagen aus frischer Luzerne höhere Gesamt-N-Gehalte auf, die vermutlich unter anderem auf Sickersaftverluste bei den aus frischer Luzerne hergestellten Silagen zurückzuführen sind. Die Reinprotein-N-Gehalte der stärker angewelkten Silagen (SA2 und SA3) waren signifikant höher als die der SF- und SA1-Silagen. Die Silagen der höchsten Anwelkstufe wiesen zudem signifikant die niedrigsten  $\alpha$ -Amino-N- und  $\text{NH}_3$ -N-Gehalte auf, wobei die Gehalte mit steigendem Anwelkgrad auch zurückgingen.

Im Mittel unterschied sich der Gesamt-N-Gehalt der unsilierten Luzerne nicht von dem der Silagen (2,51 resp. 2,58 % der TS). Im Vergleich zum Mittel der unsilierten Luzerne waren die Reinprotein-N-Gehalte der Silagen im Mittel signifikant niedriger (1,75 resp. 1,51 % der TS), die  $\alpha$ -Amino-N- und  $\text{NH}_3$ -N-Gehalte signifikant höher (0,25 resp. 0,68 % der TS und 0,03 resp. 0,17 % der TS). Dies wurde als Zeichen des Proteinabbaus während der Silierung gewertet.

Bei der Analyse der N-Fractionen im Pflanzenmaterial verblieb ein nicht analysierter Rest, der sich kalkulierte aus Gesamt-N-Gehalt minus Summe aus Reinprotein-N- und  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt. Dieser veränderte sich während des Anwelkens nicht und lag im Mittel bei der unsilierten Luzerne bei 0,51 % der TS. In den Silagen stieg dieser unanalyisierte Rest mit steigendem Anwelkgrad der Silagen von 0,22 (SF) auf 0,58 % der TS (SA3). In den SA1- und SA2-Silagen lag dieser Rest dazwischen (0,29 resp. 0,40 % der TS). Vermutlich beinhaltete diese unanalyisierte N-Fraktion langkettige Peptidverbindungen, die weder bei der Reinprotein-N- noch bei der  $\alpha$ -Amino-N-Bestimmung mit erfasst wurden. Die ansteigenden Rest-N-Gehalte bei den Silagen können darauf zurückgeführt werden, dass der Proteinabbau mit zunehmendem Anwelkgrad wahrscheinlich vermindert wurde und nicht bis zur vollständigen Hydrolyse aller Peptidbindungen ablief.

Die in den Presssäften enthaltenen Gesamt-N-Gehalte sowie die zur Charakterisierung der Presssäfte verwendeten N-Fractionen sind in Tabelle 4.14 zusammengestellt. Es erfolgte keine Reinprotein-N-Bestimmung in den Presssäften, da zum einen der Proteinabbau anhand des  $\alpha$ -Amino-N bewertet werden sollte und zum anderen die Bestimmung stark von methodischen Fehlern belastet war (siehe Tabelle 4.6). Auf eine Darstellung des im PS unanalyisierten Rest-N-Gehaltes wurde daher verzichtet.

Tabelle 4.14: Einfluss von Anwelkgrad und Pressdruck auf die N-Fractionen im Presssaft (PS) bei unsilierter Luzerne (a) und silierte (48 d) Luzerne (b) (n=3)

(a) Luzerne	Druck [kp/cm <sup>2</sup> ]	N-Fractionen [% der TSPS]			
		Gesamt-N	$\alpha$ -Amino-N	NH <sub>3</sub> -N	
unsiliert	F	60	cB 2,65 ± 0,05	dB 1,00 ± 0,02	dB 0,10 ± 0,00
		120	2,60 ± 0,04	0,99 ± 0,01	0,10 ± 0,00
	A1	60	bB 3,24 ± 0,06	cB 1,21 ± 0,04	cB 0,12 ± 0,00
		120	3,23 ± 0,03	1,23 ± 0,01	0,12 ± 0,00
	A2	60	bB 3,26 ± 0,04	bB 1,26 ± 0,02	bB 0,13 ± 0,00
		120	3,28 ± 0,06	1,28 ± 0,03	0,13 ± 0,00
	A3	60	aB 3,55 ± 0,06	aB 1,46 ± 0,01	aB 0,14 ± 0,01
		120	3,56 ± 0,07	1,45 ± 0,02	0,14 ± 0,01
(b) Luzerne	Druck [kp/cm <sup>2</sup> ]	N-Fractionen [% der TSPS]			
		Gesamt-N	$\alpha$ -Amino-N	NH <sub>3</sub> -N	
siliert	SF	60	aA 4,96 ± 0,16	aA 3,33 ± 0,23	aA 0,93 ± 0,11
		120	4,92 ± 0,13	3,17 ± 0,10	0,87 ± 0,01
	SA1	60	aA 4,98 ± 0,02	aA 3,02 ± 0,13	bA 0,81 ± 0,00
		120	5,15 ± 0,11	3,06 ± 0,44	0,83 ± 0,02
	SA2	60	bA 4,74 ± 0,11	bA 2,46 ± 0,02	cA 0,59 ± 0,02
		120	4,70 ± 0,04	2,45 ± 0,09	0,61 ± 0,01
	SA3	60	bA 4,50 ± 0,12	bA 2,32 ± 0,12	cA 0,58 ± 0,00
		120	4,73 ± 0,17	2,34 ± 0,06	0,58 ± 0,02

Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Druckstufen für p<0,05

a,b Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte jeweils für unsilierte und silierte Luzerne getrennt für p<0,05 (Druckstufen zusammengefasst)

A,B Unterschiedliche Großbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede zwischen Parametern unsilierter und silierte Luzerne gleicher Anwelkstufe für p<0,05 (Druckstufen zusammengefasst)

Die Zusammensetzung der N-Fractionen unterschied sich sowohl bei den Presssäften aus unsilierter als auch bei den Presssäften aus silierte Luzerne innerhalb der jeweiligen Anwelkstufe und über alle Anwelkstufen hinweg nicht signifikant zwischen 60 und 120 kp/cm<sup>2</sup>. Daraus wird geschlussfolgert, dass der Pressdruck keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der Presssäfte hinsichtlich der untersuchten N-Fractionen hatte. Während des Anwelkens erhöhten sich alle N-Fractionen in den Presssäften aus der unsilieren Luzerne. Nach der Fermentation lagen die Gehalte in den Presssäften der Modellsilagen aller Anwelkstufen signifikant über den entsprechenden Gehalten der Presssäfte aus unsilierter Luzerne. Mit zunehmendem Anwelkgrad der Modellsilagen nahmen die Gehalte aller N-Fractionen im PS ab, wobei sich die Presssäfte aus SA2 und SA3 nicht signifikant unterschieden.

Zur summarischen Betrachtung wurden die Gesamt-N-Gehalte der Presskuchen ermittelt

(Tabelle 4.15). Die TS-Gehalte der Presskuchen sind der Tabelle D.1 im Anhang zu entnehmen.

Tabelle 4.15: Einfluss von Anwelkgrad und Pressdruck auf Gesamt-N-Gehalte in den Presskuchen (PKu) von unsilierter und siliierter Luzerne (n=3)

	Anwelk- stufe	Druck [kp/cm <sup>2</sup> ]	Gesamt-N im PKu [% der TS]		Anwelk- stufe	Druck [kp/cm <sup>2</sup> ]	Gesamt-N im PKu [% der TS]
unsilierte Luzerne	F	60	2,45 ±0,04	silierte Luzerne	SF	60	1,97 ±0,14
		120	<sup>b</sup> 2,42 ±0,05			120	<sup>D</sup> 1,85 ±0,01
	A1	60	2,42 ±0,05		SA1	60	2,28 ±0,07
		120	<sup>b</sup> 2,46 ±0,11			120	<sup>B</sup> 2,31 ±0,07
	A2	60	2,31 ±0,08		SA2	60	2,15 ±0,03
		120	<sup>c</sup> 2,36 ±0,05			120	<sup>C</sup> 2,15 ±0,00
	A3	60	2,56 ±0,04		SA3	60	2,47 ±0,07
		120	<sup>a</sup> 2,58 ±0,06			120	<sup>A</sup> 2,51 ±0,11
<sup>a,b</sup>	Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte bei unsilierter Luzerne (60 und 120 kp·cm <sup>-2</sup> zusammengefasst) für p<0,05						
<sup>A,B</sup>	Unterschiedliche Großbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte bei siliierter Luzerne (60 und 120 kp·cm <sup>-2</sup> zusammengefasst) für p<0,05						

Weder in den Presskuchen aus unsilierter noch aus siliierter Luzerne war der Gesamt-N-Gehalt des PKu in den jeweiligen Anwelkstufen abhängig vom gewählten Pressdruck. Im Verlauf des Anwelkens verhielten sich die Gesamt-N-Gehalte ungerichtet, wobei sowohl bei unsilierter als auch bei siliierter Luzerne statistisch gesicherte Unterschiede auftraten. Im Mittel waren die Gesamt-N-Gehalte der Presskuchen aus der unsilienten Luzerne (2,44 ±0,10 % der TS) statistisch gesichert höher als die der Presskuchen aus siliierter Luzerne (2,21 ±0,23 % der TS).

In Tabelle 4.16 sind zur quantitativen Beurteilung die im PS und PKu erfassten Gesamt-N-Mengen dargestellt, die in 1 kg Ausgangsmaterial vorhanden waren.

Tabelle 4.16: Charakterisierung des Gesamt-N-Gehaltes je kg Ausgangsmaterial (unsilierte und silierte Luzerne) im Presssaft (PS) und Presskuchen (PKu) in Abhängigkeit vom Anwelkgrad und dem Pressdruck

a) Unsilierte Luzerne (n=3)

Anwelk- stufe	TS [%]	Druck [kp/cm <sup>2</sup> ]	Gesamt-N im AM [g]	Gesamt-N im PS [g]	Gesamt-N im PKu [g]	PS + PKu [g]	Anteil des Gesamt-N im PS am Gesamt-N [%]	Anteil des Gesamt- N im PKu am Gesamt-N [%]
F	17,93 ± 0,18	60 120	4,56 ± 0,13	0,71 ± 0,01 0,73 ± 0,01	3,69 ± 0,04 3,58 ± 0,10	4,39 ± 0,03 4,31 ± 0,09	15,5 ± 0,6 16,1 ± 0,8	80,9 ± 2,8 78,5 ± 1,3
A1	25,11 ± 0,38	60 120	6,25 ± 0,06	0,98 ± 0,02 1,05 ± 0,02	5,32 ± 0,06 5,21 ± 0,26	6,30 ± 0,07 6,25 ± 0,27	15,7 ± 0,5 16,7 ± 0,2	85,1 ± 1,2 83,3 ± 3,4
A2	32,38 ± 0,36	60 120	8,06 ± 0,10	0,89 ± 0,05 0,96 ± 0,03	6,65 ± 0,24 6,95 ± 0,26	7,54 ± 0,20 7,91 ± 0,25	11,0 ± 0,5 11,9 ± 0,6	82,6 ± 3,7 86,3 ± 2,7
A3	41,74 ± 0,32	60 120	10,53 ± 0,86	0,61 ± 0,01 0,65 ± 0,03	10,11 ± 0,16 10,30 ± 0,23	10,72 ± 0,17 10,95 ± 0,20	5,8 ± 0,6 6,2 ± 0,7	96,4 ± 8,5 98,2 ± 7,7

b) Silierte Luzerne (n=3)

Anwelk- stufe	TS [%]	Druck [kp/cm <sup>2</sup> ]	Gesamt-N im AM [g]	Gesamt-N im PS [g]	Gesamt-N im PKu [g]	PS + PKu [g]	Anteil des Gesamt-N im PS am Gesamt-N [%]	Anteil des Gesamt- N im PKu am Gesamt-N [%]
SF	17,47 ± 0,89	60 120	4,17 ± 0,27	1,51 ± 0,03 1,61 ± 0,05	2,83 ± 0,14 2,50 ± 0,05	4,34 ± 0,14 4,11 ± 0,10	36,3 ± 3,1 38,8 ± 1,3	68,1 ± 2,9 60,0 ± 2,9
SA1	23,24 ± 0,24	60 120	5,99 ± 0,09	1,72 ± 0,02 1,86 ± 0,06	4,49 ± 0,09 4,47 ± 0,27	6,21 ± 0,07 6,33 ± 0,23	28,6 ± 0,6 31,2 ± 1,1	74,7 ± 1,5 75,0 ± 3,8
SA2	30,71 ± 0,43	60 120	8,13 ± 0,24	1,59 ± 0,05 1,75 ± 0,08	5,95 ± 0,09 5,96 ± 0,18	7,54 ± 0,13 7,71 ± 0,10	19,5 ± 1,2 21,5 ± 1,3	73,2 ± 3,2 73,4 ± 3,6
SA3	38,92 ± 0,29	60 120	10,24 ± 0,21	1,48 ± 0,04 1,71 ± 0,13	9,14 ± 0,26 9,05 ± 0,38	10,62 ± 0,22 10,76 ± 0,39	14,5 ± 0,2 16,6 ± 1,1	89,5 ± 5,1 88,3 ± 4,2

Die Addition der Gesamt-N-Mengen von PS und PKu zeigte, dass die Gesamt-N-Menge des Ausgangsmaterials gut erfasst wurde. Differenzen sind auf Analysenfehler zurückzuführen. Die absoluten Gesamt-N-Mengen im PS nahmen sowohl bei den Presssäften aus unsilierten als auch bei denen aus silierten Luzerne mit zunehmender Anwelkstufe zunächst zu, ab Anwelkstufe A2 bzw. SA2 jedoch wieder ab. Relativ zur absoluten Gesamt-N-Menge in 1 kg Ausgangsmaterial nahm die Gesamt-N-Menge im Presssaft ab. Diese Abnahme war bei den Silagen wesentlich stärker ausgeprägt als bei dem unsilierten Pflanzenmaterial, jedoch waren die Anteile selbst bei den Silagen deutlich höher (im untersuchten TS-Bereich: unsiliert von 17 auf 6 %, siliert von 39 auf 15 %). Die Abhängigkeit des Anteils der Gesamt-N-Menge im Presssaft an der Gesamt-N-Menge in 1 kg Ausgangsmaterial ( $y$  in %) von der TS-Menge des Ausgangsmaterials ( $x$  in g TS/kg FM) zeigen folgende lineare Gleichungen:

$$\text{unsiliert: } y = 25,3^{***} - 0,04^{***} \cdot x \quad R^2=0,87 \quad s \pm 1,55 \quad p < 0,001 \quad (n=24) \quad (\text{G } 7)$$

$$\pm 1,1 \quad \pm 0,00$$

$$\text{siliert: } y = 54,6^{***} - 0,10^{***} \cdot x \quad R^2=0,94 \quad s \pm 2,15 \quad p < 0,001 \quad (n=24) \quad (\text{G } 8)$$

$$\pm 1,6 \quad \pm 0,01$$

Steigt der TS-Gehalt des Ausgangsmaterials um 10 %, sinkt der Massenanteil des Gesamt-N im Presssaft bei der unsilierten Luzerne nur um 4 %, in der silierten Luzerne um 10 %. Während bezogen auf 1 kg Ausgangsmaterial die TS-Mengenanteile im Presssaft von unsiliertem und siliertem Pflanzenmaterial mit zunehmendem TS-Gehalt nahezu analog sanken (um 5 resp. 4 %; siehe Gleichungen 5 und 6, Seite 50), verhielten sich die Gesamt-N-Mengenanteile demnach sehr differenziert. Dieser Unterschied gibt einen Hinweis auf die unterschiedlichen Zusammensetzungen der Trockenmasse der Presssäfte aus der unterschiedlich angewelkten silierten Luzerne. Mit zunehmendem Anwelkgrad der Luzernesilagen nimmt der Hydrolysierungsgrad des Gesamt-N ab, wodurch weniger mit dem Presssaft gewonnen werden kann. Dies ist vermutlich auf einen sich mit zunehmendem Anwelkgrad reduzierenden Proteinabbau zurückzuführen. Dagegen kann der um 4 % abnehmende Mengenanteil des Gesamt-N im PS während des Anwelkens der unsilierten Luzerne auf den abnehmenden TS-Mengenanteil im PS zurückgeführt werden.

#### 4.2.1.5 Definition und Festsetzung der Bezugseinheit für die Angabe der proteolytischen Aktivität in Presssäften

Die Enzym-Aktivität ist definiert als die Menge an Substrat, die in der Zeiteinheit von einem gegebenen Quantum an Substrat von einem Enzym umgesetzt wird (LÖFFLER, 2005). Die

Enzymaktivität hängt vom Substratangebot, vom pH-Wert, von der Temperatur und von verschiedenen weiteren Wirkungsfaktoren ab (KLEBER und SCHLEE, 1991). Diese Faktoren sind für die jeweiligen Zielstellungen zu standardisieren oder spezifisch zu variieren. Seit 1960 wird die Enzym-Aktivität in „Internationalen Einheiten“ ausgedrückt und ist definiert als die Absolutmenge an Substrat oder Substratprodukt in  $\mu\text{mol}$ , die je Minute und Mengeneinheit Untersuchungsmaterial unter definierten Bedingungen umgesetzt wird (KARLSON *et al.*, 1994). Als Aktivitätseinheit ist demnach entweder

- a) die Erhöhung der Spaltprodukte ( $+\mu\text{mol Spaltprodukt}/\text{min}^1$ ) oder
- b) die Verringerung des Substrats ( $-\mu\text{mol Substrat}/\text{min}^1$ )

möglich. Als Bezugseinheit können

- mg Protein,
- mg Trockengewicht oder
- mg Feuchtgewicht

je nach Eignung gewählt werden. Da für die in den eigenen Untersuchungen vorliegenden Bedingungen die Molmassen nicht bekannt sind, wird für die Quantifizierung der proteolytischen Aktivität mit der unter a) genannten Größe in angepasster Form gearbeitet. Dabei wird entsprechend der Arbeitsvorschrift (Anhang C) der in 24 Stunden freigesetzte  $\alpha$ -Amino-N je g Gesamt-N im Presssaft angegeben. Auf eine Umrechnung je Stunde oder Minute wird verzichtet, da die Methodenvorschrift ein standardisiertes Arbeiten vorgibt. Als Bezugseinheit dient der N-Gehalt des Untersuchungsmaterials, in Anlehnung an bereits bekannte Methoden zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität, bei denen das Protein ebenfalls als Bezugseinheit gewählt wurde (Tabelle 4.17, Beschreibung der Methoden in Tabelle 2.6, Seite 26).

Tabelle 4.17: Einheiten zur Angabe der proteolytischen Aktivität aus der Literatur

Einheit der proteolytischen Aktivität	Quelle
mg freigesetzter $\alpha$ -Amino-N/mg N je ml nach 5 h	BRADY, 1961
Protease units/g Protein-N	FINLEY <i>et al.</i> , 1980
$\mu\text{mol}$ freigesetzte Aminosäuren/mg Protein je h	JONES <i>et al.</i> , 1995a
$\mu\text{mol NH}_2/\text{mg Protein je h}$	SCALET <i>et al.</i> , 1984
Anstieg um 1 mg NPN über die Kontrolle in 24 h/g Protein-N	SINGH, 1962

Beispielhaft wird in Tabelle 4.18 die Beziehung der proteolytischen Aktivität der eigenen Untersuchungen auf die Bezugseinheit Gesamt-N im PS hergeleitet. Die Ergebnisse stammen aus den Untersuchungen zur Presssaftcharakterisierung.

Tabelle 4.18: Veränderung der Gesamt-N-Konzentration im Presssaft (PS) und Vergleich zweier Bezugseinheiten zur Angabe der proteolytischen Aktivität (PA) im PS aus Luzerne (Erntetermin 19.08.2004) im Verlauf des Anwelkens (n=3)

	Gesamt-N [mg/ml PS]	PA in mg freigesetzter $\alpha$ -Amino-N aus der TPL je ml PS	je g Gesamt-N im PS
F (17,9% TS)	1,22 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,00	284,85 $\pm$ 1,19
A1 (25,1% TS)	2,26 $\pm$ 0,03	0,47 $\pm$ 0,03	(207,30 $\pm$ 11,50)
A2 (32,4% TS)	3,13 $\pm$ 0,08	0,81 $\pm$ 0,04	257,78 $\pm$ 19,71
A3 (41,7% TS)	4,98 $\pm$ 0,07	1,09 $\pm$ 0,03	219,12 $\pm$ 4,39

Durch das Anwelken kam es zu einer Erhöhung der Gesamt-N-Konzentration [mg/ml PS] der Presssäfte. Daraus resultierte auch eine Aufkonzentrierung der enzymatisch aktiven Substanzen (Angabe in mg freigesetzter  $\alpha$ -Amino-N aus der TPL/ml PS). Durch die Wahl der Bezugseinheit g Gesamt-N im PS (Angabe in mg freigesetzter  $\alpha$ -Amino-N aus der TPL/g Gesamt-N im PS) wird die Plausibilität und die Verallgemeinerungsfähigkeit durch die Konzentrationsunabhängigkeit erhöht. Die Freisetzung von  $\alpha$ -Amino-N je ml PS erhöhte sich. In Bezug zu dem im PS enthaltenen Gesamt-N kam es jedoch zu einer Reduzierung der PA im Verlauf des Anwelkens. Dieses Ergebnis bestätigt die Untersuchungen von PAPADOPOULOS und MCKERSIE (1983b), die eine abnehmende Proteinaseaktivität während des Anwelkens von Luzerne, Rotklee und Hornklee feststellten.

**Die PA wird daher als freigesetzter  $\alpha$ -Amino-N aus der TPL/g Gesamt-N im PS angegeben.**

#### 4.2.1.6 Schlussfolgerungen

Mit der konzipierten in-vitro Methode kann die proteolytische Aktivität in Presssäften aus Grünfütterleguminosen sicher bestimmt werden.

Das Prinzip der Methode beruht auf der Quantifizierung der Freisetzung von  $\text{NH}_2$ -Gruppen aus einem Testproteinpräparat, die durch die summarische Bestimmung der freigesetzten Menge an  $\alpha$ -Amino-N gemessen wird. Es wird unterstellt, dass bei Einhaltung der Inkubationsbedingungen nur proteolytische Prozesse ablaufen.



Für die Bestimmung des  $\alpha$ -Amino-N-Gehaltes hat sich die Methode nach ROSEN (1957) als gut geeignet erwiesen.

Da alle Proteine anabolen und katabolen Prozessen unterliegen, d.h. in den biologischen Substraten selbst (Testproteinpräparat, Presssaft) eine Proteolyse stattfindet, ist der Grad der Proteolyse auch in diesen Medien separat zu bestimmen.

Die proteolytische Aktivität ist die Wirkung der Enzyme der wässrigen Phase (Presssaft) auf ein Testproteinpräparat (Pisane) bei Berücksichtigung der Eigenproteolyse des Presssaftes und der Eigenproteolyse des Testproteinpräparates. Sie wird durch die freigesetzte Menge an  $\alpha$ -Amino-N quantifiziert und berechnet sich wie folgt:

$$PA = PL_{\text{ges}} - PL_{\text{eigenPS}} - PL_{\text{eigenTPL}} \text{ [mg freigesetzter } \alpha\text{-Amino-N aus der TPL/ml Presssaft]}$$

Die so ermittelten Werte werden auf den im Presssaft enthaltenen Gesamt-N bezogen, so dass als Einheit **mg freigesetzter  $\alpha$ -Amino-N aus der TPL/g Gesamt-N im PS** angegeben wird.

Aus 10 verschiedenen Proteinpräparaten hat sich nach experimenteller Prüfung das Erbsenprotein Pisane der Georg Breuer GmbH als sehr gut geeignet erwiesen, da es einen hohen N-Gehalt in Verbindung mit einem geringen Gehalt an freiem  $\alpha$ -Amino-N und nur geringer eigenproteolytischer Aktivität aufweist.

Der Presssaft ist als Substrat zur Quantifizierung der proteolytischen Aktivität und des Proteinabbaus generell sehr gut geeignet. Die Gewinnung des Presssaftes ist mittels einer Tinkturenpresse realisierbar. Durch unterschiedliche Drücke wird die Zusammensetzung des Presssaftes nicht beeinflusst.

Die Veränderungen ausgewählter N-Fractionen im Presssaft spiegeln die Veränderungen im jeweiligen Ausgangsmaterial während der Silierung (Schnitt, Anwelken, Fermentation im Silo) wider. Diese Veränderungen geben Auskunft über das Ausmaß der abgelaufenen proteolytischen und desmolytischen Prozesse.

#### 4.2.2 Quantifizierung von potentiellen Einflussfaktoren auf den Proteinabbau und die proteolytische Aktivität unter in-vitro Bedingungen

##### 4.2.2.1 Einfluss externer Faktoren auf den Proteinabbau während der Fermentation

Wässrige Aufgüsse von Luzerne wurden im Rostocker Fermentationstest (RFT) unter verschiedenen Bedingungen inkubiert. Die Luzerne wurde mit einem WLK-Gehalt von 3,0 % der TS und einer Pufferkapazität von 7,0 als schwer vergärbar eingeschätzt. Der Proteinabbau

wurde anhand unterschiedlicher  $\alpha$ -Amino-N-Gehalte in den hergestellten Extrakten nach Inkubationsende (46 h) beurteilt.

#### 4.2.2.1.1 Einfluss des pH-Wertes

Durch Einstellung verschiedener Anfangs-pH-Werte der wässrigen Aufgüsse mit konzentrierter Milchsäure wurde der Einfluss des pH-Wertes auf den Proteinabbau (vergleichbar mit einer Säurezugabe als Siliermittelzusatz und/oder einer möglichst schnellen Ansäuerung im Silierprozess) untersucht. Die Auswertung der in den Aufgüssen gemessenen pH-Werte (Tabelle D.2 im Anhang) ergab, dass im Vergleich zur nicht angesäuerten Kontrolle die pH-Werte der mit Milchsäure versetzten Aufgüsse über die gesamte Inkubationszeit hinweg niedriger blieben. In Tabelle 4.19 werden die analysierten  $\alpha$ -Amino-N-Gehalte der Extrakte auf Basis des RFT nach 46 h Inkubation bei 30°C gezeigt.

Tabelle 4.19: Einfluss des pH-Wertes auf den  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt von Luzerneextrakten (0 h-Wert eingestellt mit Milchsäure) nach 46 h Inkubation bei 30°C (n=3)

0 h-pH-Wert	$\alpha$ -Amino-N-Gehalt nach 46 h [mg/ml]						
	pH 5,9 <sup>*</sup>	pH 4,8	pH 4,4	pH 4,2	pH 4,0	pH 3,8	pH 3,6
<b>Mittelwert</b>	<b>0,213<sup>a</sup></b>	<b>0,179<sup>b</sup></b>	<b>0,158<sup>c</sup></b>	<b>0,136<sup>d</sup></b>	<b>0,138<sup>d</sup></b>	<b>0,113<sup>e</sup></b>	<b>0,115<sup>e</sup></b>
<b>s</b>	±0,008	±0,004	±0,008	±0,013	±0,006	±0,005	±0,008
<sup>a,b</sup>	Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede für p<0,05						
<sup>*</sup>	Kontrolle ohne Milchsäure						

Mit sinkendem pH-Wert nahm der  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt ab. Es bestand eine gesicherte Abhängigkeit des  $\alpha$ -Amino-N-Gehaltes vom pH-Wert:

$$\alpha\text{-Amino-N [mg/ml]} = -0,05^{**} + 0,05^{***} \cdot \text{pH} \quad R^2=0,92 \quad s\pm 0,01 \quad p<0,001 \quad (n=21) \quad (G\ 9)$$

$\pm 0,01 \quad \pm 0,00$

Durch den Vergleich mit dem Ausgangs- $\alpha$ -Amino-N-Gehalt vor der Inkubation (0,086 mg/ml Extrakt, siehe 4.1.3, Seite 36) konnte geschlussfolgert werden, dass der Proteinabbau unter einem pH-Wert von 4,0 stark gemindert, jedoch nicht unterbunden wurde.

## 4.2.2.1.2 Einfluss der Osmolalität

Durch Zugabe verschieden konzentrierter KCl-Lösungen wurden unterschiedliche Osmolalitäten zu Beginn der Fermentation eingestellt. Deren Einfluss auf den während der Fermentation ablaufenden Proteinabbau (vergleichbar mit dem Anwelken des Siliergutes) wurde durch unterschiedliche  $\alpha$ -Amino-N-Gehalte der Extrakte nach Inkubation für 46 h bei 30°C deutlich wurde (Tabelle 4.20).

Tabelle 4.20: Einfluss der Osmolalität auf den  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt von Luzerneextrakten nach 46 h Inkubation bei 30°C (n=3)

osmol/kg	$\alpha$ -Amino-N-Gehalt nach 46 h [mg/ml]						
	0,08 <sup>*</sup>	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
<b>Mittelwert</b>	<b>0,213<sup>a</sup></b>	<b>0,198<sup>b</sup></b>	<b>0,192<sup>b</sup></b>	<b>0,169<sup>c</sup></b>	<b>0,157<sup>cd</sup></b>	<b>0,153<sup>de</sup></b>	<b>0,142<sup>e</sup></b>
<b>s</b>	$\pm 0,008$	$\pm 0,012$	$\pm 0,007$	$\pm 0,009$	$\pm 0,005$	$\pm 0,008$	$\pm 0,000$
<sup>a,b</sup>	Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede für p<0,05						
*	Kontrolle mit Wasser						

Mit zunehmender Osmolalität nahmen die  $\alpha$ -Amino-N-Gehalte ab. Im Vergleich zu den Werten mit unterschiedlichen Anfangs-pH-Werten (vgl. Tabelle 4.19) war jedoch die Reduzierung des Proteinabbaus geringer ausgeprägt, d.h. die  $\alpha$ -Amino-N-Gehalte in den Extrakten waren höher.

Für die Abhängigkeit des  $\alpha$ -Amino-N-Gehaltes von der Osmolalität wurde eine Regressionsgleichung mit einem hohen Bestimmtheitsmaß für Luzerne ermittelt.

$$\alpha\text{-Amino-N [mg/ml]} = 0,21^{***} - 0,02^{***} \cdot \text{osm} \quad R^2=0,90 \quad s\pm 0,01 \quad p<0,001 \quad (n=21) \quad (G 10)$$

$$\pm 0,00 \quad \pm 0,00$$

Die während der Inkubation jeweils ermittelten pH-Werte (Tabelle D.3 im Anhang) zeigten deutliche Unterschiede hinsichtlich der Schnelligkeit der pH-Wert-Absenkung. Bis 1,5 osmol/kg verliefen die pH-Werte analog zur unbehandelten Kontrolle. Der pH-Wert sank deutlich innerhalb der ersten 14 h. Bei den Varianten, die auf 2,0 bzw. 2,5 osmol/kg eingestellt wurden, fiel der pH-Wert erst nach 22 bzw. 38 h ab. Bei der Variante mit der höchsten Osmolalität wurde nach 46 h eine minimale pH-Wert-Absenkung erfasst.

#### 4.2.2.1.3 Einfluss von Kombinationen aus erniedrigten pH-Werten in Verbindung mit einer erhöhten Osmolalität

Um den kombinierten Einfluss der Faktoren während der Fermentation zu untersuchen, wurden die Aufgüsse von Luzerne mit zwei unterschiedlich konzentrierten KCl-Lösungen versetzt und mit konzentrierter Milchsäure zwei erniedrigte pH-Werte eingestellt. In Tabelle D.4 im Anhang sind die gemessenen pH-Werte während der Inkubation zu finden. Zunächst stiegen die pH-Werte in den Aufgüssen um ca. 0,3 Einheiten an, fielen dann wieder ab und erreichten mit Ausnahme der Aufgüsse mit der eingestellten hohen Osmolalität (2,0 osmol/kg) im niedrigen pH-Wert-Bereich (4,0) tiefere pH-Werte nach 46 h als zu Beginn der Fermentation eingestellt wurden. Das Absinken der pH-Werte erfolgte dabei erwartungsgemäß schneller bei den Aufgüssen mit geringerer Osmolalität. Der Anstieg der pH-Werte zu Beginn der Inkubation wird auf einsetzende Fermentationsvorgänge zurückgeführt, bei denen puffernde Substanzen frei werden können. Tabelle 4.21 zeigt die  $\alpha$ -Amino-N-Gehalte in den Extrakten nach 46-stündiger Inkubation bei 30°C.

Tabelle 4.21: Einfluss des Anfangs-pH-Wertes und der Osmolalität auf den  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt von Luzerneextrakten nach 46 h Inkubation bei 30°C (n=3)

$\alpha$ -Amino-N-Gehalt nach 46 h [mg/ml]				
0 h-pH-Wert osmol/kg	pH 4,4		pH 4,0	
	0,5	2,0	0,5	2,0
<b>Mittelwert</b>	<b>0,184<sup>aA</sup></b>	<b>0,142<sup>bA</sup></b>	<b>0,157<sup>aB</sup></b>	<b>0,135<sup>bB</sup></b>
<b>s</b>	±0,005	±0,001	±0,005	±0,000
<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede bei gleichem pH-Wert für p<0,05 <sup>A,B</sup> Unterschiedliche Großbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede bei gleicher Osmolalität für p<0,05				

In beiden pH-Wert-Bereichen führte die Erhöhung der Osmolalität zu einer Reduzierung des  $\alpha$ -Amino-N-Gehaltes. Folgende Regressionsgleichung gibt die Wirkung von pH-Wert und Osmolalität auf den  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt an:

$$\alpha\text{-Amino-N [mg/ml]} = 0,00 + 0,04^{**} \cdot \text{pH} - 0,02^{***} \cdot \text{osm} \quad R^2=0,92 \quad s \pm 0,01 \quad (\text{G 11})$$

$\pm 0,04 \quad \pm 0,01 \quad \pm 0,00 \quad p < 0,001 \text{ (n=12)}$

Um die Wirkung der beiden Faktoren eindeutiger quantifizieren zu können, wurde die Gleichung ohne die Verwendung des Absolutgliedes berechnet.

$$\alpha\text{-Amino-N (mg/ml)} = 0,04^{***} \cdot \text{pH} - 0,02^{***} \cdot \text{osm} \quad s \pm 0,01 \text{ (n=12)} \quad (\text{G 12})$$

$\pm 0,00 \quad \pm 0,00$

Da sich die Koeffizienten nicht veränderten, war diese Gleichung aussagefähig und zeigte die Wirkung von pH-Wert und Osmolalität auf den  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt. Die F-Werte der Faktoren (pH-Wert 2938; Osmolalität 86) zeigten, dass der Einfluss des pH-Wertes auf das Ausmaß der Bildung von  $\alpha$ -Amino-N größer war als der der Osmolalität.

#### 4.2.2.1.4 Einfluss der Temperatur

Es ist allgemein bekannt, dass enzymatische Reaktionen temperaturabhängig sind. Durch Inkubation der wässrigen Luzerneaufgüsse bei unterschiedlichen Temperaturen konnte die Optimaltemperatur der proteinabbauenden Enzyme bestimmt werden. In Tabelle 4.22 sind die gemessenen  $\alpha$ -Amino-N-Gehalte der Extrakte angegeben.

Tabelle 4.22: Einfluss der Temperatur auf den  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt von Luzerneextrakten nach 46 h Inkubation (n=3)

Temperatur	$\alpha$ -Amino-N-Gehalt nach 46 h [mg/ml]				
	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C
<b>Mittelwert</b>	<b>0,146<sup>d</sup></b>	<b>0,213<sup>b</sup></b>	<b>0,252<sup>a</sup></b>	<b>0,264<sup>a</sup></b>	<b>0,198<sup>c</sup></b>
<b>s</b>	±0,001	±0,008	±0,007	±0,011	±0,009

<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede für  $p < 0,05$

Die  $\alpha$ -Amino-N-Gehalte stiegen mit zunehmender Temperatur an. Bei 60°C zeigte sich allerdings die hemmende Wirkung einer zu hohen Temperatur. Die Abhängigkeit des  $\alpha$ -Amino-N-Gehaltes von der Temperatur ließ sich durch eine quadratische Funktion mit einem hohen Bestimmtheitsmaß darstellen:

$$\alpha\text{-Amino-N [mg/ml]} = -0,14^{***} + 0,02^{***} \cdot \text{temp} - 0,0002^{***} \cdot \text{temp}^2 \quad R^2=0,95 \quad s \pm 0,01 \quad (\text{G } 13) \\ \pm 0,03 \quad \pm 0,00 \quad \pm 0,000 \quad p < 0,001 \quad (n=15)$$

Durch Nullsetzen der 1. Ableitung konnte der Scheitelpunkt der quadratischen Gleichung und damit die Optimaltemperatur berechnet werden. Die Bildung von  $\alpha$ -Amino-N lief demnach bei 45°C am stärksten ab.

Die pH-Werte (Tabelle D.5 im Anhang) sanken bei 20°C am langsamsten. Der niedrigste pH-Wert nach 14 h wurde durch Inkubation bei 40°C erreicht, jedoch lag der am Inkubationsende bei 50°C gemessene pH-Wert am tiefsten.

## 4.2.2.1.5 Einfluss von Kombinationen aus pH-Wert, Osmolalität und Temperatur

Den Einfluss von Kombinationen aus pH-Wert, Osmolalität und Temperatur auf die Proteolyse zeigten die  $\alpha$ -Amino-N-Gehalte der Extrakte aus den unterschiedlich behandelten und 46 h inkubierten Luzerneaufgüssen (Tabelle 4.23).

Tabelle 4.23: Einfluss des Ausgangs-pH-Wertes, der Temperatur und der Osmolalität auf den  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt von Luzerneextrakten nach 46 h Inkubation (n=3)

Temperatur 0 h-pH-Wert osmol/kg		$\alpha$ -Amino-N-Gehalt nach 46 h [mg/ml]							
		30°C				50°C			
		pH 4,4		pH 4,0		pH 4,4		pH 4,0	
		0,5	2,0	0,5	2,0	0,5	2,0	0,5	2,0
<b>Mittelwert</b>		<b>0,184<sup>aA</sup></b>	<b>0,142<sup>bA</sup></b>	<b>0,157<sup>aB</sup></b>	<b>0,135<sup>bB</sup></b>	<b>0,248<sup>aA</sup></b>	<b>0,222<sup>bA</sup></b>	<b>0,172<sup>B</sup></b>	<b>0,165<sup>B</sup></b>
<b>s</b>		$\pm 0,005$	$\pm 0,001$	$\pm 0,005$	$\pm 0,000$	$\pm 0,005$	$\pm 0,004$	$\pm 0,016$	$\pm 0,004$
<sup>a,b</sup>	Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede bei gleichem pH-Wert für p<0,05								
<sup>A,B</sup>	Unterschiedliche Großbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede bei gleicher Osmolalität für p<0,05								

Durch die Erhöhung der Temperatur kam es zu einem signifikanten Anstieg des  $\alpha$ -Amino-N-Gehaltes (im Mittel bei 30°C: 0,154  $\pm$  0,020 mg/ml, bei 50°C 0,202  $\pm$  0,037 mg/ml). Bei 50°C führte die Erhöhung der Osmolalität im jeweiligen pH-Wert-Bereich im Vergleich zum analogen Testansatz, der bei 30°C inkubiert wurde, zu einer geringeren Reduzierung der  $\alpha$ -Amino-N-Gehalte. Deutlicher wirkte sich eine Erniedrigung des Anfangs-pH-Wertes aus.

Für eine multifaktorielle Betrachtung wurden alle ermittelten Werte in einer Regressionsgleichung zusammengefasst.

$$\alpha\text{-Amino-N [mg/ml]} = -0,02 \pm 0,02 + 0,002 \pm 0,000 \cdot \text{temp} - 0,01 \pm 0,00 \cdot \text{osm} + 0,02 \pm 0,00 \cdot \text{pH} \quad (\text{G } 14)$$

$$R^2=0,61 \quad s \pm 0,03 \quad p < 0,001 \quad (n=78)$$

Bei der Aufteilung des Absolutgliedes auf die Wirkung der Einzelfaktoren ergaben sich kaum Abweichungen zu den Werten mit konstantem Glied, so dass die Wirkung der Faktoren eindeutig quantifiziert werden konnte.

$$\alpha\text{-Amino-N [mg/ml]} = 0,002 \pm 0,000 \cdot \text{temp} - 0,01 \pm 0,00 \cdot \text{osm} + 0,02 \pm 0,00 \cdot \text{pH} \quad s \pm 0,03 \quad (n=78) \quad (\text{G } 15)$$

Bei der Überprüfung der Korrelation zwischen den Einflussgrößen (Temperatur, pH-Wert und Osmolalität) ergaben sich keine Abhängigkeiten untereinander.

In den untersuchten Bereichen der Einflussfaktoren zeigte der F-Test, dass der Einfluss auf den  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt in der Reihenfolge Osmolalität (F-Wert 16), pH-Wert (F-Wert 44) und Temperatur (F-Wert 62) zunahm.

Die ermittelten pH-Werte während der Inkubation sind den Tabellen D.4 und D.6 im Anhang zu entnehmen.

#### 4.2.2.1.6 Einfluss von Silierzusätzen

Zur Analyse des Einflusses von Zusätzen auf den Proteinabbau (MSB, MSB + Zucker, Tannine (Quebracho, Tanninsäure)) wurden die wässrigen Aufgüsse von Luzerne beimpft bzw. ihnen in verschiedenen Konzentrationen Zusätze zugefügt. Der Zusatz von Thiomersal wurde mit dem Ziel vorgenommen, die Entstehung von Mikroorganismen während der Inkubation zu unterbinden. Aufgrund der Ergebnisse wurden Aussagen zur Differenzierung der Wirkung pflanzlicher und mikrobieller Enzyme auf den Proteinabbau erwartet. In Tabelle 4.24 sind zunächst die  $\alpha$ -Amino-N-Gehalte der Extrakte mit Zusatz von MSB und MSB mit Zucker im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach 46-stündiger Inkubation bei 30°C aufgeführt.

Tabelle 4.24: Einfluss von Milchsäurebakterien (MSB) und MSB mit Zucker auf den  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt von Luzerneextrakten nach 46 h Inkubation bei 30°C (n=3)

Zusätze	$\alpha$ -Amino-N-Gehalt nach 46 h [mg/ml]		
	ohne	MSB	MSB+Zucker
<b>Mittelwert</b>	<b>0,189<sup>a</sup></b>	<b>0,191<sup>a</sup></b>	<b>0,139<sup>b</sup></b>
<b>s</b>	$\pm 0,007$	$\pm 0,003$	$\pm 0,002$

<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede für  $p < 0,05$

Die alleinige Beimpfung der Luzerneaufgüsse bewirkte gegenüber der unbehandelten Variante keine geringeren  $\alpha$ -Amino-N-Gehalte. Durch zusätzliche Ergänzung mit Zucker zu MSB fand ein signifikant geringerer Proteinabbau während der Fermentation statt. Dies unterstreicht die Bedeutung des Einsatzes von Gärsubstraten (z.B. Melasse) bei der Silierung von Grünfütterleguminosen, die einen Mangel daran aufweisen. Ein alleiniger Zusatz von Milchsäurebakterien kann bei derartigen Pflanzenmaterialien keine Vorteile hinsichtlich Verminderung des Proteinabbaus hervorrufen. Auch die Auswertung der während der Inkubation gemessenen pH-Werte (Tabelle D.7 im Anhang) unterstützt diese Aussage. Die

pH-Wert-Verläufe der Kontrolle und der nur mit Milchsäurebakterien versetzten Variante sind analog. Bei den Aufgüssen mit Milchsäurebakterien und Zucker sank der pH-Wert im Vergleich dazu zwar langsamer ab, lag aber nach 18 h bereits tiefer als die beiden anderen Varianten. Ab 26 h lag der gemessene pH-Wert unter 4,0.

Inwiefern die für ihre proteinschützenden Eigenschaften bekannten Zusätze ihre Wirkung im RFT zeigten, wurde mit den  $\alpha$ -Amino-N-Gehalten der Extrakte nach Inkubation (46 h bei 30°C) mit verschiedenen Tanninzusätzen (Quebracho und Tanninsäure) beurteilt (Tabelle 4.25).

Tabelle 4.25: Einfluss von Tanninen auf den  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt von Luzerneextrakten nach 46 h Inkubation bei 30°C (n=3)

Zusätze	ohne	$\alpha$ -Amino-N-Gehalt nach 46 h [mg/ml]					
		Quebracho [% der FM]			Tanninsäure [% der FM]		
		0,5	1,5	2,5	0,5	1,5	2,5
<b>Mittelwert</b>	<b>0,189<sup>a</sup></b>	<b>0,142<sup>b</sup></b>	<b>0,122<sup>c</sup></b>	<b>0,108<sup>d</sup></b>	<b>0,136<sup>b</sup></b>	<b>0,106<sup>d</sup></b>	<b>0,103<sup>d</sup></b>
<b>s</b>	$\pm 0,007$	$\pm 0,006$	$\pm 0,008$	$\pm 0,012$	$\pm 0,002$	$\pm 0,005$	$\pm 0,007$

<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede für  $p < 0,05$

Durch den Zusatz von Tanninen wurde der Proteinabbau verringert. Während die pH-Wert-Verläufe im RFT zeigten, dass der Quebrachozusatz keine Auswirkung auf Ansäuerung ausübte, wurde die Ansäuerung durch die Zugabe von Tanninsäure stark beeinträchtigt (Tabelle D.8 im Anhang).

Die Differenzierung des Einflusses pflanzlicher und mikrobieller Enzyme und damit deren separate Wirkung sollte mit dem Zusatz von Thiomersal abgeschätzt werden. Durch das Thiomersal wurde das Wachstum der Mikroorganismen unterbunden, was durch den nur geringen pH-Wert-Abfall während der Inkubation (von 5,6 auf 5,3) bestätigt wurde. In Tabelle 4.26 sind die  $\alpha$ -Amino-N-Gehalte von Luzerneextrakten nach 46-stündiger Inkubation bei 30°C dargestellt.



Tabelle 4.26: Veränderung der  $\alpha$ -Amino-N-Gehalte von Luzerneextrakten ohne und mit Behandlung mit Thiomersal nach 46 h Inkubation bei 30°C (n=3)

Zusätze	$\alpha$ -Amino-N-Gehalt nach 46 h [mg/ml]		
	vor Ink.	mit Thiomersal nach Ink.	ohne
<b>Mittelwert</b>	<b>0,160<sup>a</sup></b>	<b>0,266<sup>b</sup></b>	<b>0,289<sup>c</sup></b>
<b>s</b>	$\pm 0,002$	$\pm 0,003$	$\pm 0,006$
<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede für $p < 0,05$			

Der Anstieg um 0,129 mg/ml ist zurückzuführen auf pflanzliche und mikrobielle Enzyme (Gesamtproteolyse)

Der Anstieg um 0,106 mg/ml war zurückzuführen nur auf pflanzliche Enzyme

Die Differenz von 0,023 mg/ml war zurückzuführen nur auf mikrobielle Enzyme

Zwischen den  $\alpha$ -Amino-N-Gehalten der Extrakte mit und ohne Thiomersalbehandlung traten statistisch gesicherte Unterschiede auf, wobei der Gehalt der mit Thiomersal behandelten Extrakte niedriger war als der ohne. Der Anstieg des  $\alpha$ -Amino-N-Gehaltes um 0,129 mg/ml während der Inkubation in den unbehandelten Luzerneaufgüssen war demnach sowohl auf pflanzliche als auch auf mikrobielle Enzymaktivitäten zurückzuführen. Da allerdings in der unbehandelten Variante der pH-Wert im Verlauf der Inkubation abfiel (auf pH 4,5), kam es vermutlich zur Hemmung des Proteinabbaus in Folge der zuvor beschriebenen pH-Wert-Wirkung. Im Gegensatz dazu fand in den mit Thiomersal behandelten Aufgüssen eine sehr geringe pH-Wert-Absenkung von 5,6 auf 5,3 statt. Die Wirkung der pflanzlichen Enzyme konnte damit als quantitativ messbar angesehen werden. Sie führte zu einem Anstieg des  $\alpha$ -Amino-N-Gehaltes um 0,106 mg/ml. Der verbleibende Anstieg um 0,023 mg  $\alpha$ -Amino-N-Gehalte/ml ist demnach auf die Aktivität mikrobieller Enzyme zurückzuführen. Da jedoch Wechselwirkungen durch den Einfluss des pH-Wertes nicht auszuschließen sind, dürfte die mikrobielle Enzymwirkung unterschätzt sein. Es wäre empfehlenswert, den Versuch mit einer Abpufferung der während der Inkubation ohne Thiomersal gebildeten Milchsäure zu wiederholen, um den Einfluss des pH-Wertes mit gleichzeitiger Aktivität der Mikroorganismen zu unterbinden.

#### 4.2.2.2 Einfluss interner Faktoren auf die proteolytische Aktivität

Zusätzlich zur Untersuchung des Einflusses externer Faktoren, wurde der Einfluss von internen Faktoren auf die proteolytische Aktivität verschiedener Rotkleesorten untersucht. Einbezogen wurden der Vegetationsverlauf, verschiedene Aufwüchse und Sortenunterschiede. Die Untersuchungen wurden an Rotklee aufgrund des aus der Literatur bekannten gegenüber Luzerne verminderten Proteinabbaus während der Silagebereitung durchgeführt.

##### 4.2.2.2.1 Einfluss des Vegetationsstadiums

Der Einfluss des Vegetationsstadiums auf die proteolytische Aktivität wurde an den Rotkleesorten Diplomat, Pirat, Mars und Maro beurteilt. In Tabelle D.9 im Anhang sind die TS-Gehalte und die Gehalte der analysierten N-Fractionen im Verlauf der Vegetation aufgeführt. Die gemessene proteolytische Aktivität (mg freigesetzter  $\alpha$ -Amino-N aus der TPL je g Gesamt-N im PS) der vier Sorten zeigte sowohl bei den diploiden (2n) als auch bei den tetraploiden (4n) Sorten eine eindeutige Tendenz (Tabelle 4.27).

Tabelle 4.27: Einfluss des Vegetationsstadiums auf die proteolytische Aktivität (PA) im Presssaft von vier Rotkleesorten (n=3)

Vegetationsstadium	PA [mg freigesetzter $\alpha$ -Amino-N aus der TPL/g Gesamt-N im PS]			
	Sorte (Ploidiestufe)			
	Diplomat (2n)	Pirat (2n)	Mars (4n)	Maro (4n)
vor Knospe	<sup>Dc</sup> 85,7 ± 4,7	<sup>D c</sup> 94,9 ± 6,5	<sup>D b</sup> 110,8 ± 3,7	<sup>D a</sup> 121,7 ± 6,0
Beginn Knospe	<sup>Cb</sup> 122,0 ± 9,2	<sup>C b</sup> 121,1 ± 8,3	<sup>Cab</sup> 132,8 ± 4,0	<sup>C a</sup> 136,8 ± 4,5
Beginn Blüte	<sup>Ba</sup> 211,3 ± 16,9	<sup>Bab</sup> 202,2 ± 13,0	<sup>B c</sup> 168,7 ± 5,8	<sup>Bbc</sup> 183,5 ± 11,4
Blüte	<sup>A</sup> 268,6 ± 20,3	<sup>A</sup> 229,3 ± 17,8	<sup>A</sup> 248,8 ± 2,0	<sup>A</sup> 258,8 ± 3,4

<sup>A,B</sup> Unterschiedliche Großbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede im Vegetationsverlauf in einer Spalte für p<0,05

<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb der Vegetationsstadien in einer Zeile für p<0,05

Die PA stieg im Vegetationsverlauf bei allen Sorten unterschiedlich, aber signifikant an. Der Vergleich der proteolytischen Aktivitäten der Sorten innerhalb der Vegetationsstadien zeigte

signifikante Unterschiede in den ersten drei Vegetationsstadien. Die niedrigsten Werte traten dabei wechselnd bei den Sorten auf.

Der Anstieg der proteolytischen Aktivität im Vegetationsverlauf wurde auch bei der Betrachtung aller Sorten im Mittel deutlich (Tabelle 4.28).

Tabelle 4.28: Einfluss des Vegetationsstadiums auf die proteolytische Aktivität (PA) im Presssaft von Rotklee (n=12)

Vegetations- stadium	PA [mg freigesetzter $\alpha$ -Amino-N aus der TPL/g Gesamt-N im PS]			
	vor Knospe	Beginn Knospe	Beginn Blüte	Blüte
Mittel aller Sorten	<sup>D</sup> 103,3 $\pm$ 15,2	<sup>C</sup> 128,2 $\pm$ 9,2	<sup>B</sup> 191,4 $\pm$ 20,2	<sup>A</sup> 251,4 $\pm$ 19,1

<sup>A,B</sup> Unterschiedliche Großbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede im Vegetationsverlauf für  $p < 0,05$

Der Anstieg der PA war sehr deutlich ausgeprägt mit einem progressiven Anstieg zwischen den Stadien „Beginn Knospe“ und „Beginn Blüte“.

#### 4.2.2.2.2 Einfluss des Aufwuchses

Um den Einfluss des Aufwuchses auf die proteolytische Aktivität zu untersuchen, wurde von fünf diploiden Rotkleearten (Diplomat, Pirat, Harmonie, Melodie, Milvus) und fünf tetraploiden (Mars, Maro, Greif, Titus, Marathon) im Stadium Beginn Blüte der 1. und der 2. Aufwuchs geerntet und die proteolytische Aktivität im PS gemessen (Tabelle 4.29). In Tabelle D.10 im Anhang sind die TS-Gehalte und die analysierten N-Fractionen des 1. und 2. Aufwuchses der Rotkleearten angegeben.

Tabelle 4.29: Einfluss verschiedener Aufwüchse auf die proteolytische Aktivität (PA) im Presssaft (PS) von 10 Rotkleesorten (n=3)

PA [mg freigesetzter $\alpha$ -Amino-N aus der TPL/g Gesamt-N im PS]				
Aufwuchs	Sorte (Ploidiestufe)		Sorte (Ploidiestufe)	
1	Diplomat	<sup>b</sup> 211,3 $\pm$ 16,9	Mars	168,7 $\pm$ 5,8
2	(2n)	<sup>a</sup> 294,6 $\pm$ 6,4	(4n)	185,8 $\pm$ 14,4
1	Pirat	202,2 $\pm$ 13,0	Maro	183,5 $\pm$ 11,4
2	(2n)	218,5 $\pm$ 18,9	(4n)	186,8 $\pm$ 9,4
1	Harmonie	<sup>b</sup> 271,1 $\pm$ 7,8	Greif	<sup>b</sup> 172,3 $\pm$ 15,0
2	(2n)	<sup>a</sup> 333,3 $\pm$ 36,1	(4n)	<sup>a</sup> 344,4 $\pm$ 13,9
1	Melodie	<sup>b</sup> 311,8 $\pm$ 12,0	Titus	<sup>b</sup> 151,7 $\pm$ 2,0
2	(2n)	<sup>a</sup> 416,8 $\pm$ 13,8	(4n)	<sup>a</sup> 306,3 $\pm$ 12,9
1	Milvus	<sup>b</sup> 394,2 $\pm$ 3,5	Marathon	<sup>b</sup> 187,4 $\pm$ 7,8
2	(2n)	<sup>a</sup> 430,6 $\pm$ 7,8	(4n)	<sup>a</sup> 354,9 $\pm$ 15,5

<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede zwischen 1. und 2. Aufwuchs innerhalb der Sorte für  $p < 0,05$

Die Untersuchung der proteolytischen Aktivität in den RotkleePresssäften zeigte, dass bei sieben von 10 Sorten die proteolytische Aktivität des 1. Aufwuchses signifikant niedriger war als die des 2. Aufwuchses. Auch bei Gruppenbildung, d.h. Zusammenfassung der diploiden und tetraploiden Sorten sowie aller Sorten, bestätigte sich diese Aussage (Tabelle 4.30).

Tabelle 4.30: Einfluss verschiedener Aufwüchse auf die proteolytische Aktivität (PA) im Presssaft (PS) von Rotklee

PA [mg freigesetzter $\alpha$ -Amino-N aus der TPL/g Gesamt-N im PS]			
Aufwuchs	diploide Sorten (n=15)	tetraploide Sorten (n=15)	alle Sorte (n=30)
1	<sup>b</sup> 278,1 $\pm$ 73,7	<sup>b</sup> 172,7 $\pm$ 15,3	<sup>b</sup> 225,4 $\pm$ 74,9
2	<sup>a</sup> 338,8 $\pm$ 83,1	<sup>a</sup> 275,6 $\pm$ 78,2	<sup>a</sup> 307,2 $\pm$ 85,5

<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte für  $p < 0,05$

Daraus wird geschlussfolgert, dass der jahreszeitliche Einfluss bei der Silierung hinsichtlich des zu erwartenden Proteinabbaus beachtet werden sollte. Aus diesen Ergebnissen ist bei der Silierung des 2. Aufwuchses von einem stärkeren Proteinabbau auszugehen als beim 1. Aufwuchs.

#### 4.2.2.2.3 Einfluss der Sorte

Um Sortenunterschiede aufzeigen zu können, wurden die proteolytischen Aktivität sowie der  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt der Presssäfte der diploiden und der tetraploiden Rotkleesorten über alle Erntetermine hinweg (Tabelle 4.27 und Tabelle 4.29) miteinander verglichen. Es zeigten sich hinsichtlich des durchschnittlichen Gehaltes an  $\alpha$ -Amino-N im PS sowie der durchschnittlichen proteolytischen Aktivität deutliche Unterschiede zwischen diploiden und tetraploiden Rotkleesorten (Tabelle 4.31).

Tabelle 4.31: Vergleich von Stickstofffraktionen und proteolytischer Aktivität (PA) im Presssaft (PS) aus diploiden und tetraploiden Rotkleesorten (n=48)

	diploide Rotkleesorten	tetraploide Rotkleesorten
<b>Stickstofffraktionen im PS [% der TS im PS]</b>		
Gesamt-N	1,92 $\pm$ 0,39	1,79 $\pm$ 0,22
$\alpha$ -Amino-N	<sup>a</sup> 0,76 $\pm$ 0,17	<sup>b</sup> 0,67 $\pm$ 0,09
<b>PA [mg freigesetzter <math>\alpha</math>-Amino-N aus TPL/g Gesamt-N im PS]</b>		
	<sup>a</sup> 250,4 $\pm$ 109,1	<sup>b</sup> 203,2 $\pm$ 75,9

<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Zeile für  $p < 0,05$ .

Der Gesamt-N-Gehalt im PS war tendenziell niedriger im PS der tetraploiden Rotkleesorten, so dass eine geringere Abbauangreifbarkeit des Proteins erwartet werden kann. Der  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt sowie die proteolytische Aktivität waren statistisch gesichert geringer bei den tetraploiden Rotkleesorten, wobei vegetationsbedingte Einflüsse diese Aussage relativierten. Die Sorte Mars zeigte von allen Sorten die niedrigste mittlere proteolytische Aktivität mit 169,4 mg freigesetzter  $\alpha$ -Amino-N aus TPL/g Gesamt-N im PS.

#### 4.2.2.3 Schlussfolgerungen

Mit dem modifizierten Rostocker Fermentationstest erfolgte unter in-vitro Bedingungen eine Quantifizierung verschiedener Einflussgrößen auf den Proteinabbau.

Je tiefer der pH-Wert war und je schneller er abfiel, desto niedriger waren die Gehalte an  $\alpha$ -Amino-N in den Extrakten, d.h. desto geringer war der Proteinabbau. Ein tiefer pH-Wert korrelierte mit einem niedrigen Proteinabbau.

Mit steigender Osmolalität verringerten sich die  $\alpha$ -Amino-N-Gehalte in den Extrakten, d.h. dass der Proteinabbau sich reduzierte. Eine hohe Osmolalität war mit einem geringen Proteinabbau assoziiert.

Mit steigender Inkubationstemperatur bis zu 45°C erhöhte sich der Proteinabbau. Bei höheren Temperaturen kam es zu einer Reduzierung.

Mit den in-vitro Untersuchungen konnten die Wirkungen dieser drei Einflussgrößen durch gesicherte Regressionsgleichungen beschrieben und damit eindeutig nachgewiesen werden.

Eine mehrfach regressive Auswertung führte zu der Einschätzung, dass die Wirkung der drei Einflussgrößen auf den Proteinabbau in der Reihenfolge Temperatur, pH-Wert, Osmolalität abnahm.

Die Quantifizierung des Einflusses der Zusätze von Milchsäurebakterien, Melasse und Tanninen zu Aufgüssen des modifizierten RFT auf den Proteinabbau lieferte eindeutige Ergebnisse.

Milchsäurebakterien bewirkten nur bei Gegenwart von ausreichend Gärsubstrat (Zucker) eine Reduzierung des Proteinabbaus. Bei einem Mangel an Gärsubstrat in dem zu silierenden Pflanzenmaterial muss unbedingt ein entsprechender Zusatz erfolgen, wenn der Proteinabbau eingeschränkt werden soll. Dieser Sachverhalt führt zu der Annahme, dass nicht die Milchsäurebakterien per se den Proteinabbau reduzieren, sondern der durch ihre Aktivität verursachte pH-Wert-Abfall.

Die Ergänzung von Tanninen in den Aufgüssen des modifizierten RFT als natürliche sekundäre Inhaltsstoffe in vielen Futterpflanzen führte in diesen in-vitro Untersuchungen zu einer eindeutigen Reduzierung der  $\alpha$ -Amino-N-Gehalte und damit des Proteinabbaus.

Ein Zusatz von Thiomersal zu Aufgüssen des modifizierten RFT führte zur Verhinderung mikrobiellen Wachstums, wodurch eine Aussage zur Wirkung pflanzlicher Enzyme getroffen werden könnte. Da jedoch die Wirkung der mikrobiellen Enzyme nicht eindeutig bestimmt werden konnte, sind weitere Untersuchungen nötig.

Die proteolytische Aktivität wird von dem Vegetationsstadium, dem Aufwuchs und durch Sortenunterschiede beeinflusst.

Im Vegetationsverlauf nahm die proteolytische Aktivität bei allen untersuchten Rotkleesorten zu. Der Vergleich von Proben des gleichen Vegetationsstadiums vom 1. und 2. Aufwuchs zeigte eine höhere proteolytische Aktivität der Proben des 2. Aufwuchses.

Die Rotkleesorten, die sich in diploide und tetraploide Sorten unterschieden, wiesen eine unterschiedliche proteolytische Aktivität auf. Bei den tetraploiden Sorten war die

proteolytische Aktivität statistisch gesichert niedriger als bei den diploiden Sorten, wobei vegetationsbedingte Einflüsse die Aussage relativierten.

Die Kenntnisse dieser Einflüsse auf die proteolytische Aktivität und das Ausmaß des Proteinabbaus, ermittelt über die oben genannten in-vitro Untersuchungen, sind bei weiterer Validierung durch Experimente mit analogen Modellsilagen dazu geeignet, die Sicherheit dieser Aussagen zu erhöhen.

#### 4.2.3 Proteinabbau in Modellsilagen

Der Proteinabbau wurde in allen Phasen der Silierung, d.h. ab dem Schnitt über das Anwelken bis zur Fermentation in Modellsilagen bzw. bei der Herstellung von Frischsilagen ab dem Schnitt und während der Fermentation in Modellsilagen an Hand von ausgewählten Stickstofffraktionen untersucht.

Die Modellsilagen wurden aus Luzerne (Erntetermin 13.05.2004) und Klee gras hergestellt. Zur Charakterisierung des Pflanzenmaterials sind relevante Parameter in Tabelle 4.32 dargestellt.

Tabelle 4.32: Charakterisierung des Pflanzenmaterials zur Herstellung der Modellsilagen

Pflanzen- material	TS [%]	Rohasche [% d. TS]	Gerüstsubstanz [% d. TS]		Pufferkapazität [g Milchsäure/100 g TS]
			ADF	NDF	
Luzerne (n=3)	13,6 ±0,2	13,8 ±0,1	40,2 ±0,7	44,2 ±0,7	7,7 ±0,2
Klee gras (n=1)	16,7	11,5	22,4	38,3	7,7

Die verwendete Luzerne wies im Vergleich zu Tabellenwerten (DLG, 1997) einen hohen Gerüstsubstanzanteil für dieses Vegetationsstadium auf. Die Pufferkapazität lag in dem für Luzerne üblichen Bereich (HERTWIG und BUNDESARBEITSKREIS FUTTERKONSERVIERUNG, 2006) und war demzufolge als hoch einzustufen. Mit einem WLK-Gehalt von 5,0 % der TS wurde die verwendete Luzerne als schwer vergärbar eingestuft. Die Inhaltsstoffe des Klee grasses lagen auf vergleichbarem Niveau zu den Tabellenwerten, jedoch war die Pufferkapazität höher als erwartet.

## 4.2.3.1 Proteolyse, Desmolyse und proteolytische Aktivität während des Anwelkens

Die Veränderungen der N-Fractionen beginnen der Literatur zu Folge ab dem Schnitt des zu silierenden Grüngutes (SEYFARTH *et al.*, 1989b; MCDONALD *et al.*, 1991). Daher wurden die ausgewählten N-Fractionen bei Luzerne (Tabelle 4.33) und Klee gras (Tabelle 4.34) im Verlauf des Anwelkens untersucht.

Tabelle 4.33: Einfluss des Anwelkens auf den TS-Gehalt und den Gehalt ausgewählter N-Fractionen im Ausgangsmaterial und Presssaft von Luzerne (n=3)

Ausgangsmaterial für die Presssaftgewinnung					
	TS [%]		Gesamt-N* [% d. TS]		Reinprotein-N* [% d. TS]
Frisch	<sup>d</sup> 13,6 ±0,2		<sup>a</sup> 3,22 ±0,03		<sup>c</sup> 1,78 ±0,04
Anwelk1	<sup>c</sup> 21,2 ±0,3		<sup>c</sup> 2,86 ±0,03		<sup>d</sup> 1,68 ±0,01
Anwelk2	<sup>b</sup> 22,5 ±0,1		<sup>b</sup> 3,08 ±0,02		<sup>a</sup> 1,93 ±0,01
Anwelk3	<sup>a</sup> 27,7 ±0,5		<sup>b</sup> 3,02 ±0,06		<sup>b</sup> 1,85 ±0,01
Presssaft					
	TSPS [%]		Gesamt-N* [% d. TSPS]	fr. AS-N* [% d. TSPS]	NH <sub>3</sub> -N* [% d. TSPS]
Frisch	<sup>c</sup> 4,34 ±0,02		<sup>ab</sup> 3,14 ±0,09	0,99 ±0,01	0,12 ±0,00
Anwelk1	<sup>b</sup> 6,99 ±0,11		<sup>ab</sup> 3,20 ±0,00	1,10 ±0,04	0,10 ±0,01
Anwelk2	<sup>b</sup> 7,52 ±0,01		<sup>b</sup> 3,12 ±0,06	1,00 ±0,04	0,09 ±0,01
Anwelk3	<sup>a</sup> 9,37 ±0,01		<sup>a</sup> 3,30 ±0,03	1,12 ±0,05	0,12 ±0,00

<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte für p<0,05.  
 \* Gesamtstickstoff: Gesamt-N; Reinproteinstickstoff: Reinprotein-N; freier Aminosäurenstickstoff: fr. AS-N; Ammoniakstickstoff: NH<sub>3</sub>-N

Bei dem Trockensubstanzanstieg von 14 auf 28 % nahm der Gesamt-N-Gehalt im Ausgangsmaterial ab, was auf Bröckelverluste während der Trocknung zurückgeführt wurde. Der Reinprotein-N-Gehalt nahm zu Beginn des Anwelkens deutlich ab, stieg jedoch danach wieder an. Da die Werte über den Gehalten des frischen Materials lagen, sind sowohl Trockenmasseverluste als auch Probleme bei der Reinprotein-N-Bestimmung als Fehlerquelle denkbar. Der Trockensubstanzgehalt im PS stieg während des Anwelkens signifikant an. Tendenziell nahmen der Gesamt-N- und der freie AS-N-Gehalt im PS zu, während der NH<sub>3</sub>-N-Gehalt unverändert blieb. Demzufolge überwogen während des Anwelkens proteolytische Prozesse. Diese bewirkten den Anstieg des Gesamt-N im PS. Durch das Anwelken, d.h. die Erhöhung der TS, stieg erwartungsgemäß die Osmolalität von 389 auf 837 mosmol/kg PS (siehe Tabelle D.11 im Anhang).



Analoge Aussagen hinsichtlich des Proteinabbaus konnten tendenziell auch aus den Parametern des Kleegrases getroffen werden (Tabelle 4.34). Aus technischen Gründen wurde jedoch nur mit n=1 gearbeitet.

Tabelle 4.34: Einfluss des Anwelkens auf den TS-Gehalt und den Gehalt ausgewählter N-Fractionen im Ausgangsmaterial und Presssaft von Klee gras

Ausgangsmaterial für die Presssaftgewinnung			Presssaft (N-Fractionen in % der TSPS)			
TS [%]	Gesamt-N* [% d. TS]	Reinprotein-N* [% d. TS]	TSPS [%]	Gesamt-N*	fr. AS-N*	NH <sub>3</sub> -N*
16,7	3,31	2,41	7,57	2,13	0,67	0,05
23,0	3,18	2,26	10,59	1,81	0,66	0,04
31,4	3,40	2,40	14,59	2,06	0,74	0,05
37,9	3,42	2,30	17,93	2,15	0,77	0,05

\* Gesamtstickstoff: Gesamt-N; Reinproteinstickstoff: Reinprotein-N; freier Aminosäurenstickstoff: fr. AS-N; Ammoniakstickstoff: NH<sub>3</sub>-N

Während des Anwelkens von 17 auf 38 % TS veränderten sich der Gesamt-N- und der Reinprotein-N-Gehalt nicht gerichtet. Der NH<sub>3</sub>-N-Gehalt in den Presssäften der Anwelkstufen blieb nahezu konstant, wohingegen der freie AS-N-Gehalt in der Tendenz anstieg. Daraus wurde ebenfalls geschlussfolgert, dass die Proteolyse bereits während des Anwelkens stattfand, wobei keine Anzeichen für desmolytische Prozesse nachweisbar waren.

Den Einfluss des Anwelkens auf die proteolytische Aktivität im PS von Luzerne und Klee gras zeigt Tabelle 4.35.

Tabelle 4.35: Abhängigkeit der proteolytischen Aktivität (PA) im Presssaft (PS) aus Luzerne (n=3) und Klee gras vom Anwelkgrad

Anwelkstufe	Proteolytische Aktivität [mg freigesetzter $\alpha$ -Amino-N aus der TPL/g Gesamt-N im PS]			
	TS [%]	Luzerne	TS [%]	Klee gras
Frisch	14	<sup>a</sup> 337,6 ± 4,1	17	144,1
Anwelk1	21	<sup>b</sup> 205,1 ± 6,9	23	134,0
Anwelk2	23	<sup>b</sup> 204,6 ± 4,1	31	113,6
Anwelk3	28	<sup>c</sup> 169,7 ± 3,9	38	87,7

<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte für p<0,05.

Eine Erhöhung des Anwelkgrades führte bei Luzerne zu einer statistisch abgesicherten Reduzierung der proteolytischen Aktivität. Tendenziell konnte diese Aussage auch durch die Werte des Klee grases bestätigt werden.

Die Auswertung der pH-Werte der Presssäfte zeigte, dass weder bei der Luzerne noch beim Klee gras ein vorzeitiger Beginn der Fermentation während des Anwelkens stattgefunden hat (Tabelle 4.36).

Tabelle 4.36: pH-Werte während des Anwelkens in Luzerne- und Klee graspresssaft

Anwelkstufe	TS [%]	pH-Wert im Presssaft von		TS [%]	Klee gras
		Luzerne (n=3)			
Frisch	14	<sup>a</sup> 5,67 ± 0,02		17	6,12
Anwelk1	21	<sup>b</sup> 5,74 ± 0,03		23	6,20
Anwelk2	23	<sup>b</sup> 5,78 ± 0,01		31	6,36
Anwelk3	28	<sup>b</sup> 5,79 ± 0,01		38	6,28

<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte für  $p < 0,05$ .

Die pH-Werte sanken bei beiden Pflanzen während des Anwelkens nicht ab, so dass die bisher getroffenen Aussagen nicht relativiert werden müssen. Der Anstieg der pH-Werte ist sehr gering und vermutlich auf den steigenden Gesamt-N-Gehalt der Presssäfte zurückzuführen.

#### 4.2.3.2 Proteolyse und Desmolyse während der Fermentation in Modellsilagen

Der Einfluss der Silierung, vor allem der Silierbedingungen, auf die Veränderung der N-Fractionen und damit auf die Proteolyse und die Desmolyse wurde mittels unterschiedlich angewerkter und mit verschiedenen Silierzusätzen hergestellter Modellsilagen untersucht. Da durch diese Behandlungsformen die Einflüsse der zuvor unter in-vitro Bedingungen untersuchten externen Faktoren, vor allem der des pH-Wertes, ebenfalls von Bedeutung waren, standen die aus den in-vitro Untersuchungen getroffenen Aussagen zur Validierung an.

##### 4.2.3.2.1 Modellsilagen aus Luzerne

Aus den Ergebnissen der in-vitro Untersuchungen konnte die Notwendigkeit einer schnellen pH-Wert-Absenkung zu Beginn der Silierung abgeleitet werden. Als unbedingt zu erreichender pH-Wert, um den Proteinabbau zu inhibieren, wurde ein pH-Wert von etwa 4,0 ausgewiesen. Die Beeinflussung des pH-Wertes sollte durch unterschiedliche Silierzusätze (ohne, Melasse, MSB oder MSB+Melasse) erfolgen. Im PS der Modellsilagen wurde der pH-Wert im Verlauf der Silierung erfasst. Zur Bewertung des Proteinabbaus (Proteolyse und Desmolyse) wurden die Veränderungen ausgewählter N-Fractionen im Verlauf der Silagelagerung bis 96 Tage ausgewertet.

##### *Frischsilagen*

Bei den Frischsilagen wurden neben einer unbehandelten Kontrolle als Silierzusätze Melasse (4 % der FM) und eine Kombination von Melasse und MSB ( $3 \cdot 10^5$  KbE/g FM) verwendet. Mit dem alleinigen Zusatz von Melasse sollte untersucht werden, inwieweit der natürliche Mikroorganismenbesatz in der Lage war, mit Zusatz einer Gärsubstratquelle eine Konservierung zu garantieren. Der kombinierte Zusatz von Melasse mit MSB diene als erwartete Optimalvariante. Die Beurteilung des Silierverlaufes erfolgte anhand der in den Presssäften gemessenen pH-Werte (Tabelle 4.37).

Tabelle 4.37: Veränderung des pH-Wertes im Presssaft (PS) von Luzernefrischsilagen während der Silierung mit unterschiedlichen Silierzusätzen (n=3)

		pH-Werte im PS von <b>Luzernefrischsilagen</b>		
Öffnung	Zusatz	ohne	Melasse *	MSB+Melasse *
nach 1d		<sup>A<sub>c</sub></sup> 6,10 ±0,03	<sup>A<sub>a</sub></sup> 6,30 ±0,04	<sup>A<sub>b</sub></sup> 6,21 ±0,04
nach 3d		<sup>C<sub>a</sub></sup> 4,20 ±0,03	<sup>B<sub>a</sub></sup> 4,20 ±0,01	<sup>B<sub>b</sub></sup> 3,91 ±0,01
nach 6d		<sup>D<sub>a</sub></sup> 4,07 ±0,00	<sup>C<sub>a</sub></sup> 4,05 ±0,13	<sup>C<sub>b</sub></sup> 3,66 ±0,02
nach 12d		<sup>E<sub>a</sub></sup> 4,00 ±0,02	<sup>C<sub>a</sub></sup> 3,97 ±0,09	<sup>D<sub>b</sub></sup> 3,58 ±0,01
nach 24d		<sup>E<sub>a</sub></sup> 4,02 ±0,02	<sup>D<sub>b</sub></sup> 3,74 ±0,03	<sup>E<sub>c</sub></sup> 3,54 ±0,02
nach 48d		<sup>E<sub>a</sub></sup> 4,02 ±0,03	<sup>E<sub>b</sub></sup> 3,46 ±0,02	<sup>G<sub>c</sub></sup> 3,33 ±0,02
nach 96d		<sup>B<sub>a</sub></sup> 4,36 ±0,02	<sup>E<sub>b</sub></sup> 3,37 ±0,09	<sup>F<sub>b</sub></sup> 3,37 ±0,02

<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Zeile für p<0,05

<sup>A,B</sup> Unterschiedliche Großbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte für p<0,05

\* MSB: Milchsäurebakterien ( $3 \cdot 10^5$  KBE/g FM); Melasse (40 g/kg FM)

Durch den Zusatz von Melasse wurde der pH-Wert-Abfall erst ab dem 24. Tag signifikant gegenüber der unbehandelten Kontrolle verbessert. Die Variante MSB+Melasse zeigte ab dem 3. Tag die niedrigsten pH-Werte. Der zur Verminderung des Proteinabbaus angestrebte pH-Wert von etwa 4,0 wurde zu diesem Zeitpunkt bereits unterschritten. Der natürliche Mikroorganismenbesatz erreichte diesen pH-Wert mit Zusatz von Melasse zwischen dem 6. und 12. Tag und führte nach 96 Tagen zu einer gleich tiefen Säuerung wie die zugesetzten Bakterien. In der unbehandelten Kontrolle kam es aufgrund von Gärsubstratmangel nicht zur Unterschreitung des zur Inhibierung des Proteinabbaus notwendigen pH-Wertes. Dieses Ergebnis bestätigte damit die Aussagen der in-vitro Untersuchungen (Tabelle 4.24, S.64). Es kam zudem zu einem „Umkippen“ dieser Silagen. Die bis dahin gebildete Milchsäure wurde zu Essigsäure und weiteren Nebengärungsprodukten abgebaut (siehe Tabelle D.12 im Anhang). Inwieweit sich dies auch bei der Proteolyse und der Desmolyse zeigte, wurde anhand ausgewählter N-Fractionen ermittelt (Tabelle 4.38). Da sich in den Ausgangsmaterialien zur Presssaftgewinnung (Modellsilagen) keine Tendenz hinsichtlich einer Veränderung des TS-Gehaltes und des Gesamt-N-Gehaltes im Silierverlauf zeigte, wurden diese Werte zusammengefasst (n=21). Auch die TS-Gehalte der aus den Modellsilagen gewonnenen Presssäfte wurden aus diesem Grund in der Tabelle gemittelt.

Tabelle 4.38: Gehalt an TS und ausgewählten N-Fractionen im silierten Ausgangsmaterial (Luzernefrischsilagen mit verschiedenen Silierzusätzen) und Veränderung dieser Parameter im Presssaft während des Silierens

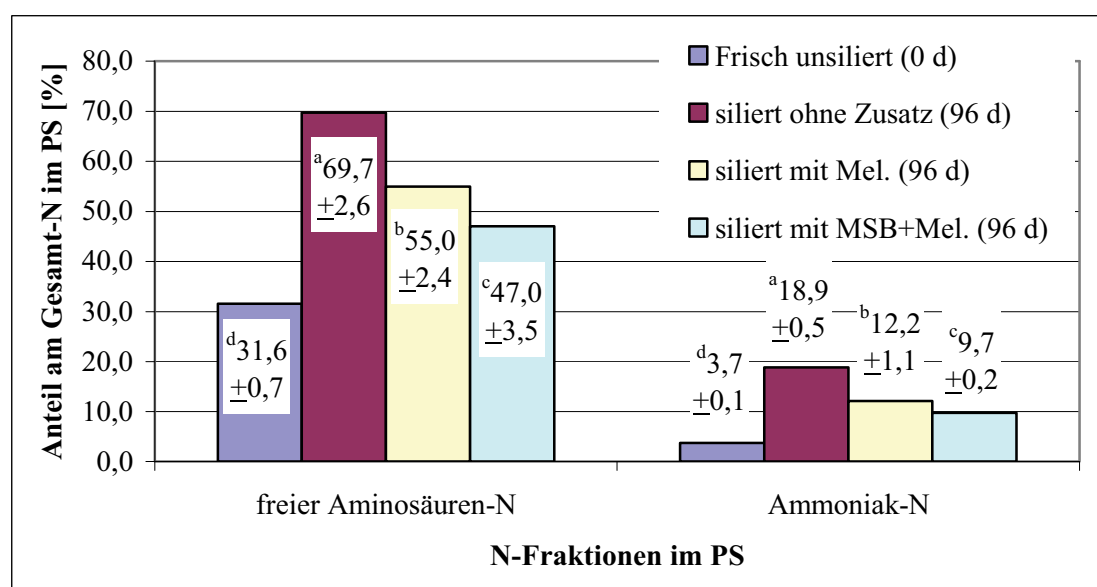
Silierzusatz	Luzernefrischsilagen					
	ohne		Melasse*		MSB+Melasse*	
Öffnungstag	Ausgangsmaterial für die Presssaftgewinnung (n=21)					
	TS [%]					
1 - 96d	13,22	±0,50	15,86	±0,59	15,34	±0,41
	Gesamt-N [% der TS]					
1 – 96d	3,08	±0,10	2,99	±0,08	3,00	±0,06
	Presssaft					
	TSPS [%] (n=21)					
1 – 96d	4,94	±0,37	7,89	±0,71	7,35	±0,24
	Stickstofffraktionen im Presssaft (n=3)					
	Gesamt-N (% der TSPS)					
1d	<sup>f</sup> 3,62	±0,06	<sup>e</sup> 2,80	±0,08	<sup>d</sup> 2,95	±0,01
3d	<sup>e</sup> 4,02	±0,06	<sup>d</sup> 3,29	±0,10	<sup>c</sup> 3,34	±0,06
6d	<sup>de</sup> 4,20	±0,05	<sup>d</sup> 3,37	±0,12	<sup>c</sup> 3,42	±0,06
12d	<sup>cd</sup> 4,37	±0,09	<sup>c</sup> 3,65	±0,12	<sup>b</sup> 3,68	±0,04
24d	<sup>c</sup> 4,47	±0,16	<sup>ab</sup> 3,98	±0,11	<sup>b</sup> 3,70	±0,07
48d	<sup>b</sup> 4,94	±0,20	<sup>bc</sup> 3,85	±0,10	<sup>ab</sup> 3,79	±0,10
96d	<sup>a</sup> 6,17	±0,05	<sup>a</sup> 4,12	±0,26	<sup>a</sup> 3,84	±0,07
	freier Aminosäurenstickstoff [% der TSPS]					
1d	<sup>f</sup> 1,64	±0,03	<sup>e</sup> 0,97	±0,05	<sup>d</sup> 1,02	±0,02
3d	<sup>e</sup> 2,39	±0,05	<sup>d</sup> 1,46	±0,11	<sup>c</sup> 1,49	±0,03
6d	<sup>d</sup> 2,64	±0,18	<sup>c</sup> 1,82	±0,01	<sup>bc</sup> 1,56	±0,07
12d	<sup>c</sup> 2,86	±0,05	<sup>b</sup> 1,89	±0,08	<sup>a</sup> 1,79	±0,03
24d	<sup>c</sup> 3,00	±0,08	<sup>a</sup> 2,20	±0,07	<sup>ab</sup> 1,72	±0,10
48d	<sup>b</sup> 3,42	±0,19	<sup>a</sup> 2,13	±0,14	<sup>a</sup> 1,73	±0,15
96d	<sup>a</sup> 4,30	±0,15	<sup>a</sup> 2,27	±0,16	<sup>a</sup> 1,81	±0,11
	Ammoniakstickstoff [% der TSPS]					
1d	<sup>g</sup> 0,22	±0,01	<sup>e</sup> 0,14	±0,00	<sup>g</sup> 0,16	±0,00
3d	<sup>f</sup> 0,43	±0,01	<sup>d</sup> 0,28	±0,03	<sup>f</sup> 0,25	±0,00
6d	<sup>e</sup> 0,48	±0,01	<sup>cd</sup> 0,30	±0,04	<sup>e</sup> 0,26	±0,01
12d	<sup>d</sup> 0,57	±0,03	<sup>c</sup> 0,35	±0,01	<sup>d</sup> 0,29	±0,00
24d	<sup>c</sup> 0,73	±0,03	<sup>b</sup> 0,43	±0,02	<sup>c</sup> 0,31	±0,00
48d	<sup>b</sup> 0,87	±0,03	<sup>b</sup> 0,44	±0,04	<sup>b</sup> 0,33	±0,01
96d	<sup>a</sup> 1,16	±0,04	<sup>a</sup> 0,50	±0,06	<sup>a</sup> 0,37	±0,01

<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte und eines Parameters für p<0,05

\* MSB: Milchsäurebakterien ( $3 \cdot 10^5$  KbE/g FM); Melasse (40 g/kg FM)

Im PS stiegen die Gehalte von Gesamt-N, freiem AS-N und  $\text{NH}_3\text{-N}$  während der Fermentation in Modellsilagen in Abhängigkeit von der Behandlung unterschiedlich stark, aber immer signifikant an. Während die Anstiege dieser N-Fractionen in den unbehandelten Frischsilagen am höchsten waren (1,7-; 2,6- resp. 5,3-fach), verringerten sie sich über die Melasse-Variante (1,5-; 2,3- resp. 3,6-fach) zur MSB+Melasse-Variante (1,3; 1,8 resp. 2,3-fach) deutlich.

In der Tabelle 4.38 wird bewusst auf eine Auswertung des Einflusses der Zusätze auf die N-Gehalte im PS verzichtet, da die Zugabe von Melasse zu einer Erhöhung des TS-Gehaltes führte und dieser Vergleich daher nicht korrekt wäre. Daher wurde, um die die Proteolyse und Desmolyse charakterisierenden Parameter (freier Aminosäurenstickstoff bzw.  $\text{NH}_3\text{-N}$ ) vergleichen zu können, ihr Anteil nicht an der TS, sondern am jeweils im PS enthaltenen Gesamt-N herangezogen (Abbildung 4.3). Die jeweiligen N-Gehalte des Presssaftes aus dem unsilierten frischen Pflanzenmaterial zur Berechnung der Anteile sind der Tabelle 4.33, Seite 73 zu entnehmen.



<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer N-Fraktion für  $p < 0,05$   
 MSB: Milchsäurebakterien ( $3 \cdot 10^5$  KbE/g FM); Mel.: Melasse (40 g/kg FM)

Abbildung 4.3: Anteil des freien Aminosäurenstickstoffs und des Ammoniakstickstoffs am Gesamtstickstoff (Gesamt-N) im Presssaft (PS) von unsilierter frischer Luzerne und den daraus hergestellten Modellsilagen in Abhängigkeit von den Zusätzen

Durch die während der Fermentation in den Modellsilagen ablaufende Proteolyse erhöhte sich der Anteil des freien AS-N am Gesamt-N im PS signifikant in allen Modellsilagen, wobei er im PS der mit MSB und Melasse behandelten Modellsilagen signifikant niedriger lag als im PS der unbehandelten und der mit Melasse behandelten Luzernefrischsilagen. Durch die Behandlung mit der Kombination aus MSB und Melasse konnte die Desmolyse im Vergleich zu den unbehandelten und den mit Melasse behandelten Luzernefrischsilagen ebenfalls signifikant reduziert werden. Diese Aussagen bestätigten die der pH-Wert-Auswertung (Tabelle 4.37, Seite 77). Somit wird die Verwendung eines Milchsäurebakterienpräparates in Verbindung mit einer Gärsubstratquelle zur Herstellung qualitativ hochwertiger Luzernefrischsilagen mit geringerer Proteolyse und Desmolyse empfohlen.

### Anwelksilagen

An dem angewelkten Siliergut wurden in den ersten beiden Anwelkstufen, die sich durch die Länge der Feldliegezeit unterschieden (Anwelk1 21,2 % Ausgangs-TS-Gehalt nach 6 h und Anwelk2 22,5 % Ausgangs-TS-Gehalt nach 24 h über Nacht), ein kombinierter Zusatz aus MSB ( $3 \cdot 10^5$  KbE/g FM) und Melasse (4 % der FM) getestet und der Silierverlauf anhand der pH-Werte im PS beurteilt (Tabelle 4.39).

Tabelle 4.39: Veränderung des pH-Wertes im Presssaft (PS) von Luzerneanwelksilagen (Anwelk1 und 2) während der Silierung mit und ohne Silierzusatz (n=3)

		pH-Werte im PS von <b>Luzerneanwelksilagen</b>			
		<b>Anwelk1</b>		<b>Anwelk2</b>	
Zusatz	Öffnung	ohne	MSB+Melasse*	ohne	MSB+Melasse*
nach 1d		<sup>Ab</sup> 5,96 ±0,02	<sup>Aa</sup> 6,06 ±0,06	<sup>Bb</sup> 5,63 ±0,08	<sup>Ba</sup> 5,82 ±0,05
nach 3d		<sup>Aa</sup> 4,61 ±0,06	<sup>Bb</sup> 3,86 ±0,02	<sup>Ba</sup> 4,49 ±0,01	<sup>Ab</sup> 3,94 ±0,02
nach 6d		<sup>Aa</sup> 4,31 ±0,01	<sup>Bb</sup> 3,66 ±0,02	<sup>Ba</sup> 4,23 ±0,11	<sup>Ab</sup> 3,75 ±0,04
nach 12d		<sup>a</sup> 4,13 ±0,01	<sup>Bb</sup> 3,57 ±0,03	<sup>a</sup> 4,10 ±0,02	<sup>Ab</sup> 3,68 ±0,01
nach 24d		<sup>a</sup> 3,97 ±0,03	<sup>Bb</sup> 3,53 ±0,01	<sup>a</sup> 3,94 ±0,02	<sup>Ab</sup> 3,63 ±0,04
nach 48d		3,77 ±0,16	3,56±0,05	<sup>a</sup> 3,89 ±0,03	<sup>b</sup> 3,64 ±0,01
nach 96d		<sup>a</sup> 3,69 ±0,06	<sup>b</sup> 3,40 ±0,04	<sup>a</sup> 3,73 ±0,08	<sup>b</sup> 3,47 ±0,04

<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede zwischen Behandlungen einer Anwelkstufe für p<0,05

<sup>A,B</sup> Unterschiedliche Großbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede zwischen den Anwelkstufen mit gleicher Behandlung für p<0,05

\* MSB: Milchsäurebakterien ( $3 \cdot 10^5$  KbE/g FM); Melasse (40 g/kg FM)

Die pH-Werte nahmen in beiden Anwelkstufen unabhängig vom Zusatz während der Lagerdauer signifikant ab (Signifikanzen aufgrund der Übersichtlichkeit nicht in Tabelle 4.39 dargestellt). Durch den Zusatz von MSB und Melasse fiel der pH-Wert innerhalb der ersten 3 Tage bei beiden Anwelkstufen schneller ab als ohne Zusatz. Der aus den in-vitro Untersuchungen ermittelte, den Proteinabbau hemmende pH-Wert von etwa 4,0 wurde nach dieser kurzen Silierdauer bereits unterschritten. Ohne Zusatz dauerte dies in beiden Anwelkstufen 24 Tage. Der Vorteil, niedrigere pH-Werte durch einen Silierzusatz zu erreichen, blieb bis zum 96. Tag erhalten. Beim Vergleich der Anwelkstufen untereinander lagen die pH-Werte ohne Zusatz bis zum 6. Tag in den Silagen der Anwelkstufe 1 höher. Ab dem 12. Tag wurde kein Unterschied mehr festgestellt. Durch die Behandlung mit MSB und Melasse waren zu den Öffnungsterminen bis einschließlich 24. Tag die pH-Werte der Anwelk2-Silagen höher, mit Ausnahme des 1. Öffnungstermins. Die Proteolyse und die Desmolyse wurden anhand der Veränderungen ausgewählter N-Fractionen beurteilt (Tabelle 4.40). Der TS- und Gesamt-N-Gehalt der Ausgangsmaterialien sowie der TS-Gehalt der Presssäfte wurden zusammengefasst, da sich keine gerichteten Veränderungen über die gesamte Silierdauer hinweg zeigten.



Tabelle 4.40: Gehalt an TS und ausgewählten N-Fractionen im silierten Ausgangsmaterial (Luzerneanwelksilagen, 2 Feldliegezeiten, ohne und mit Silierzusatz) und Veränderung dieser Parameter im Presssaft während des Silierens

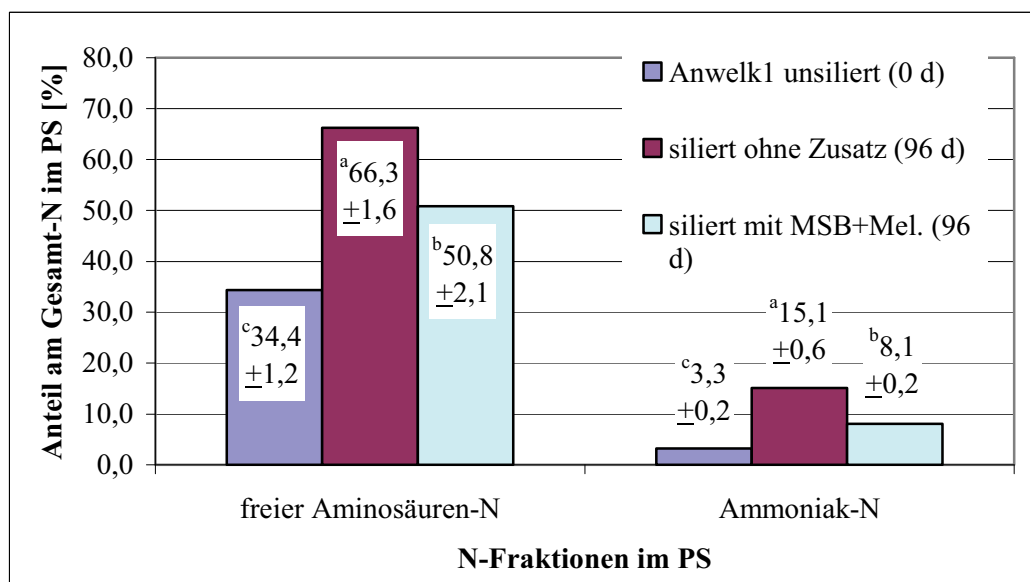
Luzerneanwelksilagen								
	Anwelk1				Anwelk2			
Silierzusatz	ohne		MSB+Melasse*		ohne		MSB+Melasse*	
Öffnungstag	Ausgangsmaterial für die Presssaftgewinnung (n=21)							
	TS [%]							
1 – 96d	20,80	±0,38	22,01	±0,69	22,30	±0,58	23,02	±0,65
	Gesamt-N [% der TS]							
1 - 96d	2,93	±0,05	2,94	±0,06	3,16	±0,09	3,12	±0,07
	Presssaft							
	TSPS [%] (n=21)							
1 - 96d	8,63	±0,24	10,11	±0,38	8,67	±1,13	10,15	±0,91
	Stickstofffraktionen im Presssaft (n=3)							
	Gesamt-N [% der TSPS]							
1d	<sup>d</sup> 3,37	±0,15	<sup>c</sup> 2,95	±0,06	<sup>c</sup> 4,31	±0,10	<sup>e</sup> 3,97	±0,13
3d	<sup>c</sup> 3,95	±0,03	<sup>b</sup> 3,29	±0,10	<sup>b</sup> 5,13	±0,09	<sup>d</sup> 4,43	±0,14
6d	<sup>ab</sup> 4,14	±0,14	<sup>a</sup> 3,68	±0,24	<sup>b</sup> 5,18	±0,22	<sup>cd</sup> 4,54	±0,18
12d	<sup>bc</sup> 4,10	±0,07	<sup>a</sup> 3,62	±0,16	<sup>ab</sup> 5,42	±0,20	<sup>ab</sup> 4,87	±0,20
24d	<sup>ab</sup> 4,24	±0,04	<sup>a</sup> 3,68	±0,15	<sup>a</sup> 5,75	±0,13	<sup>bc</sup> 4,83	±0,17
48d	<sup>a</sup> 4,30	±0,05	<sup>a</sup> 3,72	±0,23	<sup>a</sup> 5,72	±0,20	<sup>ab</sup> 4,87	±0,18
96d	<sup>a</sup> 4,32	±0,15	<sup>a</sup> 3,75	±0,12	<sup>a</sup> 5,72	±0,22	<sup>a</sup> 5,17	±0,19
	freier Aminosäurenstickstoff [% der TSPS]							
1d	<sup>d</sup> 1,40	±0,07	<sup>e</sup> 0,78	±0,16	<sup>e</sup> 1,32	±0,03	<sup>f</sup> 1,03	±0,23
3d	<sup>cd</sup> 1,89	±0,07	<sup>d</sup> 1,24	±0,09	<sup>cd</sup> 1,80	±0,38	<sup>de</sup> 1,14	±0,12
6d	<sup>bc</sup> 2,17	±0,56	<sup>c</sup> 1,51	±0,10	<sup>c</sup> 1,85	±0,47	<sup>cd</sup> 1,38	±0,28
12d	<sup>bc</sup> 2,24	±0,48	<sup>bc</sup> 1,60	±0,14	<sup>bc</sup> 2,07	±0,07	<sup>bc</sup> 1,47	±0,05
24d	<sup>bc</sup> 2,59	±0,36	<sup>ab</sup> 1,77	±0,04	<sup>bc</sup> 2,12	±0,31	<sup>ab</sup> 1,78	±0,06
48d	<sup>bc</sup> 2,58	±0,58	<sup>a</sup> 1,88	±0,23	<sup>ab</sup> 2,52	±0,23	<sup>a</sup> 1,96	±0,19
96d	<sup>a</sup> 2,86	±0,14	<sup>a</sup> 1,91	±0,08	<sup>a</sup> 2,74	±0,17	<sup>a</sup> 2,08	±0,17
	Ammoniakstickstoff [% der TSPS]							
1d	<sup>g</sup> 0,18	±0,02	<sup>c</sup> 0,15	±0,01	<sup>g</sup> 0,21	±0,01	<sup>d</sup> 0,15	±0,01
3d	<sup>f</sup> 0,34	±0,01	<sup>b</sup> 0,17	±0,00	<sup>f</sup> 0,32	±0,01	<sup>c</sup> 0,20	±0,00
6d	<sup>e</sup> 0,42	±0,02	<sup>a</sup> 0,21	±0,03	<sup>e</sup> 0,37	±0,02	<sup>c</sup> 0,20	±0,02
12d	<sup>d</sup> 0,46	±0,01	<sup>a</sup> 0,21	±0,01	<sup>d</sup> 0,42	±0,02	<sup>bc</sup> 0,22	±0,03
24d	<sup>c</sup> 0,53	±0,01	<sup>a</sup> 0,22	±0,01	<sup>c</sup> 0,49	±0,02	<sup>b</sup> 0,26	±0,03
48d	<sup>b</sup> 0,58	±0,01	<sup>a</sup> 0,28	±0,03	<sup>b</sup> 0,56	±0,02	<sup>b</sup> 0,25	±0,02
96d	<sup>a</sup> 0,65	±0,05	<sup>a</sup> 0,30	±0,02	<sup>a</sup> 0,67	±0,05	<sup>a</sup> 0,33	±0,03

<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte und eines Parameters für  $p < 0,05$

\* MSB: Milchsäurebakterien ( $3 \cdot 10^5$  KBE/g FM); Melasse (40g/kg FM)

Im PS stiegen die Gehalte von Gesamt-N, freiem AS-N und  $\text{NH}_3$ -N während der Silierung bei beiden Anwelkstufen signifikant an. Die Auswertung des Einflusses der Behandlung auf die Proteolyse und Desmolyse erfolgt wiederum aus genanntem Grunde mittels der Anteile des

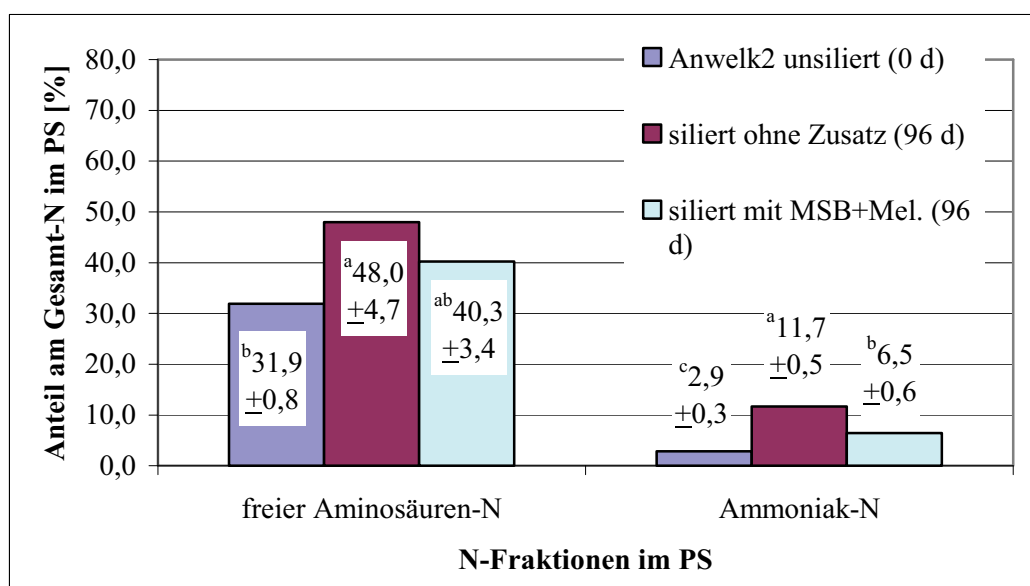
freien AS-N und des  $\text{NH}_3$ -N am Gesamt-N im PS (Abbildung 4.4 und Abbildung 4.5). Die jeweiligen N-Gehalte des Presssaftes aus dem unsilierten angewelkten Pflanzenmaterial zur Berechnung der Anteile sind der Tabelle 4.33, Seite 73 zu entnehmen.



<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer N-Fraktion für  $p < 0,05$   
 MSB: Milchsäurebakterien ( $3 \cdot 10^5$  KBE/g FM); Mel.: Melasse (40 g/kg FM)

Abbildung 4.4: Anteil des freien Aminosäurenstickstoffs und des Ammoniakstickstoffs am Gesamtstickstoff (Gesamt-N) im Presssaft (PS) von unsilierter angewelkter Luzerne (Anwelk1: 21,2 % TS) und den daraus hergestellten Modellsilagen in Abhängigkeit von den Zusätzen

Die Proteolyse und die Desmolyse wurden bei den Modellsilagen der Anwelkstufe 1 signifikant durch die Zugabe der Silierzusätze reduziert. In der Anwelkstufe 2 zeigte sich dies analog, tendenziell bei der Proteolyse und statistisch abgesichert bei der Desmolyse (Abbildung 4.5).



<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer N-Fraktion für  $p < 0,05$   
 MSB: Milchsäurebakterien ( $3 \cdot 10^5$  KbE/g FM); Mel.: Melasse (40 g/kg FM)

Abbildung 4.5: Anteil des freien Aminosäurenstickstoffs und des Ammoniakstickstoffs am Gesamtstickstoff (Gesamt-N) im Presssaft (PS) von unsilierter angewelkter Luzerne (Anwelk2: 22,5 % TS) und den daraus hergestellten Modellsilagen in Abhängigkeit von den Zusätzen

Bei beiden Anwelkstufen erhöhte sich während der Fermentation in Modellsilagen durch die Proteolyse der Anteil des freien AS-N und durch die Desmolyse der Anteil des  $\text{NH}_3$ -N am Gesamt-N im PS signifikant unabhängig von der Behandlungsform. Eine Ausnahme bildete der Anteil des freien AS-N am Gesamt-N im PS bei mit MSB und Melasse behandelten Modellsilagen von Anwelkstufe 2, bei denen diese Aussage nur in der Tendenz zutraf.

Neben der Beeinflussung des Proteinabbaus durch den pH-Wert sind zusätzlich die höheren Osmolalitäten der Anwelk2-Silagen im Vergleich zu den Anwelk1-Silagen zu berücksichtigen (Tabelle D.11 im Anhang). Dadurch sind die auf statistisch gesichert niedrigerem Niveau liegenden Anteile von den Anwelk2-Silagen unabhängig von der Behandlung im Vergleich zu den jeweiligen der Anwelk1-Silagen erklärbar.

Von der am längsten (28 h) angewelkten Luzerne (Anwelk3 27,7% TS im Ausgangsmaterial zur Silierung) wurden Modellsilagen ohne Behandlung und Silagen mit einem Zusatz von MSB ( $3 \cdot 10^5$  KbE/g FM) hergestellt. Melasse wurde bei dieser Anwelkstufe nicht zugesetzt, da unter praxisrelevanten Bedingungen bei diesem TS-Bereich auf eine Zugabe von Melasse verzichtet werden kann (MCDONALD *et al.*, 1991).

Die pH-Werte zeigten auch hier den Vorteil einer Beimpfung mit MSB (Tabelle 4.41).

Tabelle 4.41: Veränderung des pH-Wertes im Presssaft (PS) von Luzerneanwelksilagen (Anwelk3) während der Silierung ohne und mit Silierzusatz (n=3)

Zusatz Öffnung	pH-Werte im PS von <b>Luzerneanwelksilagen</b> <b>Anwelk3</b>	
	ohne	MSB <sup>*</sup>
nach 1d	<sup>Aa</sup> 5,82 ±0,03	<sup>A</sup> <sup>b</sup> 5,66 ±0,06
nach 3d	<sup>Ba</sup> 4,73 ±0,07	<sup>B</sup> <sup>b</sup> 4,15 ±0,08
nach 6d	<sup>Ca</sup> 4,41 ±0,03	<sup>C</sup> <sup>b</sup> 3,91 ±0,01
nach 12d	<sup>D</sup> 4,26 ±0,01	<sup>C</sup> 3,94 ±0,21
nach 24d	<sup>Ea</sup> 4,08 ±0,01	<sup>CDb</sup> 3,80 ±0,01
nach 48d	<sup>E</sup> 3,98 ±0,15	<sup>CD</sup> 3,75 ±0,12
nach 96d	<sup>Fa</sup> 3,79 ±0,03	<sup>D</sup> <sup>b</sup> 3,64 ±0,08

<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Zeile für p<0,05

<sup>A,B</sup> Unterschiedliche Großbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte für p<0,05

<sup>\*</sup> MSB: Milchsäurebakterien ( $3 \cdot 10^5$  KBE/g FM)

Die pH-Werte sowohl ohne als auch mit MSB-Zusatz sanken während der Lagerung signifikant ab, wobei die mit MSB behandelten Silagen niedrigere Werte aufwiesen. Trotz der erhöhten Osmolalität, die durch das Anwelken erreicht wurde (Tabelle D.11 im Anhang), sank der pH-Wert unter 4,0 durch Beimpfung mit MSB zum 6. Tag und bei den Silagen ohne Behandlung nach 48 Tagen.

Die Veränderung der N-Fractionen im PS während des Fermentationsprozesses in Modellsilagen ist in Tabelle 4.42 dargestellt. Da sich ebenfalls keine gerichteten Veränderungen des TS- und Gesamt-N-Gehaltes der Ausgangsmaterialien sowie des TS-Gehaltes der Presssäfte über die gesamte Silierdauer hinweg zeigten, wurden diese Werte zusammengefasst.

Tabelle 4.42: Gehalt an TS und ausgewählten N-Fractionen im Ausgangsmaterial (Luzerneanwelksilagen, längste Feldliegezeit, ohne und mit Silierzusatz) und Veränderung dieser Parameter im Presssaft während des Silierens

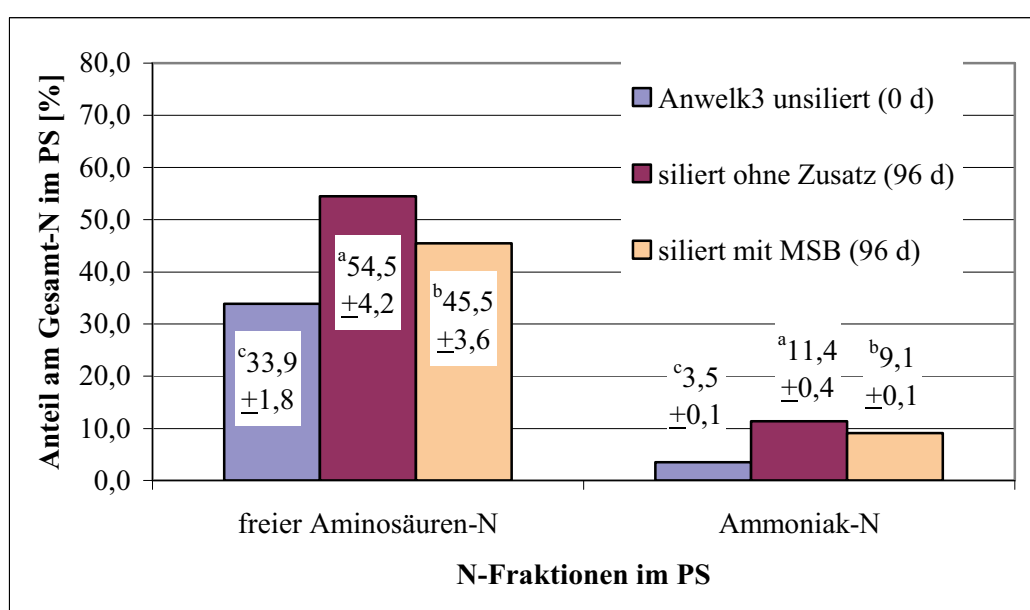
Silierzusatz	Luzerneanwelksilagen (Anwelk3)			
	ohne		MSB*	
Öffnungstag	Ausgangsmaterial für die Presssaftgewinnung (n=21)			
	TS [%]			
1 - 96d	26,70	±0,65	26,77	±0,79
	Gesamt-N [% der TS]			
1 - 96d	3,11	±0,06	3,12	±0,08
	Presssaft			
	TSPS [%] (n=21)			
1 – 96d	10,75	±0,68	10,48	±0,87
	Stickstofffraktionen im Presssaft (n=3)			
	Gesamt-N [% der TSPS]			
1d	<sup>c</sup> 4,31	±0,16	<sup>c</sup> 4,29	±0,19
3d	<sup>b</sup> 4,94	±0,04	<sup>b</sup> 4,67	±0,18
6d	<sup>a</sup> 5,27	±0,07	<sup>a</sup> 5,32	±0,13
12d	<sup>a</sup> 5,29	±0,12	<sup>a</sup> 5,30	±0,16
24d	<sup>a</sup> 5,33	±0,20	<sup>a</sup> 5,35	±0,12
48d	<sup>a</sup> 5,45	±0,04	<sup>a</sup> 5,32	±0,10
96d	<sup>a</sup> 5,37	±0,26	<sup>a</sup> 5,48	±0,09
	freier Aminosäurenstickstoff [% der TSPS]			
1d	<sup>e</sup> 1,51	±0,29	<sup>d</sup> 1,74	±0,14
3d	<sup>d</sup> 1,83	±0,15	<sup>c</sup> 1,94	±0,09
6d	<sup>c</sup> 2,41	±0,29	<sup>c</sup> 2,11	±0,15
12d	<sup>bc</sup> 2,55	±0,09	<sup>a</sup> 2,70	±0,06
24d	<sup>ab</sup> 2,82	±0,12	<sup>ab</sup> 2,67	±0,04
48d	<sup>ab</sup> 2,86	±0,17	<sup>ab</sup> 2,60	±0,09
96d	<sup>a</sup> 2,92	±0,16	<sup>b</sup> 2,49	±0,16
	Ammoniakstickstoff [% der TSPS]			
1d	<sup>g</sup> 0,21	±0,01	<sup>e</sup> 0,23	±0,01
3d	<sup>f</sup> 0,32	±0,00	<sup>de</sup> 0,26	±0,01
6d	<sup>e</sup> 0,38	±0,01	<sup>d</sup> 0,29	±0,01
12d	<sup>d</sup> 0,43	±0,01	<sup>c</sup> 0,35	±0,05
24d	<sup>c</sup> 0,51	±0,03	<sup>c</sup> 0,38	±0,04
48d	<sup>b</sup> 0,57	±0,02	<sup>b</sup> 0,43	±0,02
96d	<sup>a</sup> 0,61	±0,01	<sup>a</sup> 0,50	±0,01

<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte und eines Parameters für p<0,05

\* MSB: Milchsäurebakterien ( $3 \cdot 10^5$  KbE/g FM)

Im PS stiegen die Gehalte von Gesamt-N, freiem AS-N und NH<sub>3</sub>-N während der Fermentation in Modellsilagen wiederum signifikant an. Die relativen Anstiege der Gehalte der N-Fractionen freier AS-N und NH<sub>3</sub>-N waren in den unbehandelten Modellsilagen (1,9- resp. 2,9-fach) höher als in den mit MSB behandelten Modellsilagen (1,4- resp. 2,2-fach).

Auch bei dieser Anwelkstufe konnte der Vorteil des Silierzusatzes an Hand des Vergleichs der Anteile der die Proteolyse bzw. Desmolyse charakterisierenden Parameter (fr. AS-N und  $\text{NH}_3\text{-N}$ ) am Gesamt-N im PS nachgewiesen werden (Abbildung 4.6). Die jeweiligen N-Gehalte des Presssaftes aus dem unsilierten angewelkten Pflanzenmaterial zur Berechnung der Anteile sind der Tabelle 4.33, Seite 73 zu entnehmen.



<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer N-Fraktion für  $p < 0,05$   
 MSB: Milchsäurebakterien ( $3 \cdot 10^5$  KBE/g FM)

Abbildung 4.6: Anteil des freien Aminosäurenstickstoffs und des Ammoniakstickstoffs am Gesamtstickstoff (Gesamt-N) im Presssaft (PS) von unsiliierter angewelkter Luzerne (Anwelk3: 27,7 % TS) und den daraus hergestellten Modellsilagen in Abhängigkeit von den Zusätzen

In Folge von Proteolyse und Desmolyse während der Fermentation in Modellsilagen stiegen die Anteile von freiem AS-N und  $\text{NH}_3\text{-N}$  am Gesamt-N im PS bei beiden Behandlungsformen signifikant an. Der alleinige Zusatz von MSB bewirkte eine signifikante Reduzierung beider Prozesse.

Aus Kapazitätsgründen wurde nur von den Modellsilagen, die nach 96 Tagen geöffnet wurden, der Reinprotein-N-Gehalt bestimmt (Tabelle 4.43).

Tabelle 4.43: Reinprotein-N-Gehalte und Anteil des Reinprotein-N am Gesamt-N von unterschiedlich angewelkten Modellsilagen aus Luzerne nach 96 Tagen Silierdauer in Abhängigkeit von der Behandlung (n=3)

Reinprotein-N-Gehalt [% der TS] und Anteil des Reinprotein-N am Gesamt-N [%] von Modellsilagen aus Luzerne nach 96 d				
Behandlung*	Frisch	Anwelk1	Anwelk2	Anwelk3
ohne	<sup>Bb</sup> 0,88 ±0,04 <sup>Cb</sup> 27,2 ±1,2	<sup>B</sup> 0,86 ±0,01 <sup>BC</sup> 29,6 ±1,1	<sup>A</sup> 0,98 ±0,05 <sup>AB</sup> 31,8 ±2,2	<sup>A</sup> 1,01 ±0,03 <sup>A</sup> 32,7 ±0,3
Mel	<sup>b</sup> 0,81 ±0,04 <sup>b</sup> 26,7 ±0,5	-	-	-
MSB+Mel	<sup>Aa</sup> 0,97 ±0,05 <sup>ABa</sup> 31,5 ±0,9	<sup>B</sup> 0,88 ±0,04 <sup>B</sup> 30,0 ±1,5	<sup>A</sup> 1,02 ±0,03 <sup>A</sup> 32,7 ±1,0	-
MSB	-	-	-	1,03 ±0,04 34,0 ±1,6

<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte je Parameter für  $p < 0,05$

<sup>A,B</sup> Unterschiedliche Großbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Zeile für  $p < 0,05$

\* MSB: Milchsäurebakterien ( $3 \cdot 10^5$  KBE/g FM); Mel.: Melasse (40 g/kg FM)

Der Vergleich der Werte zeigte, dass durch den Zusatz von Milchsäurebakterien in Kombination mit Melasse der Reinprotein-N-Gehalt in allen Anwelkstufen anstieg, jedoch nur bei den Frischsilagen signifikant. Das Anwelken bewirkte ebenfalls eine Erhöhung der Reinprotein-N-Gehalte, sofern kein Silierzusatz verwendet wurde. Die Modellsilagen der Anwelkstufen 2 und 3 wiesen signifikant höhere Reinprotein-N-Gehalte auf als die Frisch- und Anwelk1-Silagen. Die Anteile des Reinprotein-N am Gesamt-N verhielten sich analog, wonach sowohl das Anwelken als auch der Zusatz von Milchsäurebakterien und Melasse zu einer Erhöhung der Anteile führten.

#### 4.2.3.2.2 Modellsilagen aus Klee gras

Zur Charakterisierung des Proteinabbaus in einer weiteren Grünfütterleguminosenart wurden Modellsilagen aus frischem (16,7 % TS) und angewelktem Klee gras (37,9 % TS) hergestellt, die nach 1, 3 und 96 Tagen geöffnet wurden.

Tabelle 4.44 zeigt die pH-Werte der Klee grassilagen aus frischem und angewelktem Pflanzenmaterial im Verlauf der Fermentation in Modellsilagen.

Tabelle 4.44: Veränderung des pH-Wertes im Presssaft (PS) von Klee gras Frisch- und Anwelksilagen während der Silierung (n=3)

Material Öffnung		pH-Werte im PS von <b>Klee grassilagen</b>	
		frisch	angewelkt
nach 1d	<sup>A</sup>	5,95 ±0,02	<sup>A</sup> 5,91 ±0,03
nach 3d	<sup>Bb</sup>	4,65 ±0,05	<sup>Ba</sup> 5,84 ±0,03
nach 96d	<sup>Cb</sup>	3,77 ±0,01	<sup>Ca</sup> 4,10 ±0,01

<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Zeile für p<0,05

<sup>A,B</sup> Unterschiedliche Großbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte für p<0,05

Sowohl bei den Frisch- als auch bei den Anwelksilagen lief eine Ansäuerung während der Fermentation ab, wobei der pH-Wert von 4,0 in den Anwelksilagen nicht unterschritten wurde. Da jedoch in Folge des Anwelkens von einer Erhöhung der Osmolalität ausgegangen wird, ist eine mehrfaktorielle Beeinflussung des Proteinabbaus anzunehmen, wie die in-vitro Untersuchungen gezeigt haben.

Die Veränderungen der N-Fractionen im PS infolge von Proteolyse und Desmolyse werden in Tabelle 4.45 dargestellt. Da sich die TS- und Gesamt-N-Gehalte der Modellsilagen sowie die TS-Gehalte ihrer Presssäfte ungerichtet verhielten, wurden sie als Mittelwert über die gesamte Silierdauer hinweg angegeben.

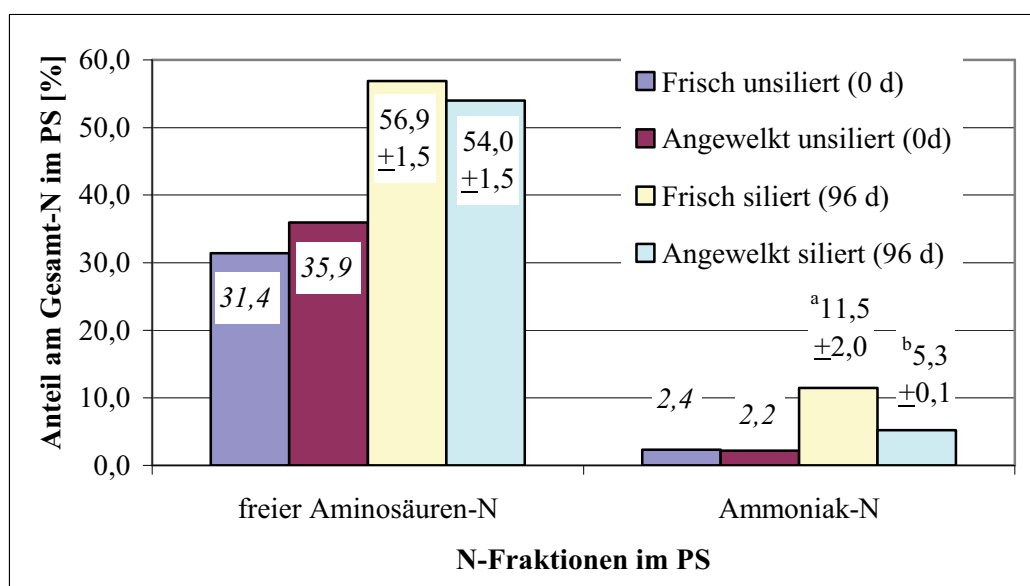


Tabelle 4.45: Gehalt an TS und ausgewählten N-Fractionen im Ausgangsmaterial (Silagen aus frischem und angewelktem Klee gras) und Veränderung dieser Parameter im Presssaft während des Silierens

ÖT	Klee grassilagen	
	aus frischem Material	aus angewelktem Material
nach	<b>Ausgangsmaterial für die Presssaftgewinnung (n=9)</b>	
	TS [%]	
1, 3, 96d	16,67 ±0,55	35,39 ±0,92
	Gesamt-N [% der TS]	
1, 3, 96d	3,40 ±0,07	3,54 ±0,13
	<b>Presssaft</b>	
	TSPS [%] (n=9)	
1, 3, 96d	7,98 ±0,60	20,62 ±1,93
	Stickstofffraktionen im Presssaft (n=3)	
	Gesamt-N [% der TSPS]	
1d	<sup>c</sup> 3,07 ±0,08	<sup>c</sup> 2,78 ±0,42
3d	<sup>b</sup> 3,77 ±0,05	<sup>b</sup> 3,56 ±0,02
96d	<sup>a</sup> 4,74 ±0,12	<sup>a</sup> 4,90 ±0,08
	freier Aminosäurenstickstoff [% der TSPS]	
1d	<sup>c</sup> 1,33 ±0,05	<sup>c</sup> 1,22 ±0,08
3d	<sup>b</sup> 1,85 ±0,04	<sup>b</sup> 1,87 ±0,04
96d	<sup>a</sup> 2,69 ±0,01	<sup>a</sup> 2,65 ±0,10
	Ammoniakstickstoff [% der TSPS]	
1d	<sup>c</sup> 0,07 ±0,00	<sup>c</sup> 0,08 ±0,01
3d	<sup>b</sup> 0,23 ±0,01	<sup>b</sup> 0,11 ±0,00
96d	<sup>a</sup> 0,54 ±0,10	<sup>a</sup> 0,26 ±0,00

<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte und eines Parameters für  $p < 0,05$

Der Anstieg der Gehalte der N-Fractionen im PS während der Silierung war auch bei den Klee grassilagen signifikant. Zum Vergleich des Ausmaßes von Proteolyse und Desmolyse in Frisch- und Anwelksilagen wurden die jeweiligen Anteile von freiem AS-N und Ammoniakstickstoff am Gesamt-N im PS gegenüber gestellt (Abbildung 4.7). Zur Berechnung der Anfangsanteile im unsilierten Material dienten die in Tabelle 4.34, Seite 74 angegebenen Werte.



<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer N-Fraktion für  $p < 0,05$

Abbildung 4.7: Anteil des freien Aminosäurenstickstoffs und des Ammoniakstickstoffs am Gesamtstickstoff (Gesamt-N) im Presssaft (PS) von unsiliertem Klee gras (frisch: 16,7 % TS und angewelkt: 37,9 % TS) und den daraus hergestellten Modellsilagen

Durch das Anwelken des Klee grases wurde die Desmolyse deutlich reduziert. Der Anteil des Ammoniakstickstoffs am Gesamt-N im PS lag in den Anwelksilagen signifikant unter dem Anteil der Frischsilagen. Der Vergleich der Anteile des freien AS-N am Gesamt-N im PS zeigte jedoch nur ein tendenziell geringeres Ausmaß der Proteolyse in den Anwelksilagen.

Die Reinprotein-N-Gehalte der Modellsilagen unterschieden sich nicht signifikant und lagen in den Frisch- und Anwelksilagen bei 1,2 % der TS. Auch die Anteile des Reinprotein-N am Gesamt-N der Frisch- bzw. Anwelksilagen waren mit 34 resp. 32 % nicht signifikant verschieden.

#### 4.2.3.3 Einfluss des pH-Wertes und der Osmolalität auf die proteolytische Aktivität

Der Prozess des Proteinabbaus ist stark von pH-Wert und Osmolalität abhängig. Da aber der pH-Wert und die Osmolalität im Hinblick auf den Proteinabbau prinzipiell gegensätzlich wirken (Erhöhung der Osmolalität senkt den Proteinabbau, Erhöhung des pH-Wertes erhöht den Proteinabbau), sollte der Einfluss dieser Faktoren auf die proteolytische Aktivität selbst näher untersucht werden. Dafür wurden im PS der unbehandelten Luzernesilagen (Frisch bis Anwelkstufe 2) sowie im PS der Luzernesilagen mit Zusatz von MSB und Melasse (pH-

Werte: Tabelle 4.37, Seite 77 und Tabelle 4.39, Seite 80; Osmolalitäten Tabelle D.11 im Anhang) die proteolytische Aktivität bestimmt (Tabelle 4.46).

Tabelle 4.46: Veränderung der proteolytischen Aktivität (PA) im Presssaft (PS) während der Silierung von Luzerne mit unterschiedlichen Osmolalitäten (n=3)

ÖT	Beh.	Frisch	Anwelk1	Anwelk2
<b>Osmolalität im unsilierten Ausgangsmaterial [mosmol/kg]</b>				
0d	ohne	<sup>C</sup> 389 ±1	<sup>B</sup> 639 ±11	<sup>A</sup> 673 ±1
<b>PA [mg freigesetzter α-Amino-N aus TPL/g Gesamt-N im PS]</b>				
1d	ohne	<sup>Aa</sup> 243,9 ±11,1	<sup>B</sup> 183,1 ±10,2	<sup>C</sup> 129,5 ±26,7
	mit*	<sup>Ab</sup> 198,1 ± 7,2	<sup>B</sup> 171,3 ± 7,1	<sup>C</sup> 105,0 ± 7,0
3d	ohne	<sup>A</sup> 157,7 ± 2,1	<sup>ABa</sup> 141,9 ± 5,4	<sup>B</sup> 99,1 ±44,2
	mit*	<sup>A</sup> 139,6 ±12,5	<sup>Bb</sup> 91,5 ± 4,7	<sup>C</sup> 59,6 ± 3,2
6d	ohne	<sup>Cb</sup> 55,0 ± 8,1	<sup>Aa</sup> 81,3 ± 2,1	<sup>Ba</sup> 66,6 ± 5,4
	mit*	<sup>Aa</sup> 86,4 ± 6,7	<sup>Ab</sup> 71,5 ± 3,8	<sup>Bb</sup> 33,7 ±11,6
12d	ohne	<sup>AB</sup> 52,4 ± 4,8	<sup>Aa</sup> 61,7 ± 1,1	<sup>B</sup> 39,3 ±10,7
	mit*	<sup>A</sup> 57,8 ± 6,4	<sup>Bb</sup> 38,8 ± 4,3	<sup>B</sup> 45,7 ± 2,7
24d	ohne	34,8 ±15,9	24,3 ± 0,9	41,1 ± 6,8
	mit*	40,6 ± 3,5	28,3 ±13,4	29,7 ± 4,4
48d	ohne	34,7 ± 4,1	30,7 ±11,8	<sup>a</sup> 31,4 ± 0,9
	mit*	<sup>A</sup> 40,5 ± 3,8	<sup>A</sup> 37,0 ±14,7	<sup>Bb</sup> 17,6 ± 3,4
96d	ohne	<sup>Aa</sup> 37,6 ± 5,6	<sup>Ba</sup> 19,1 ± 4,3	<sup>B</sup> 14,0 ± 0,4
	mit*	<sup>Ab</sup> 18,0 ± 4,1	<sup>Cb</sup> 5,3 ± 1,6	<sup>B</sup> 11,1 ± 2,0

<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte zwischen den Behandlungen an einem Öffnungstag für p<0,05

<sup>A,B</sup> Unterschiedliche Großbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Zeile für p<0,05

\* Milchsäurebakterien (3·10<sup>5</sup> KBE/g FM) und Melasse (40g/kg FM)

Bereits am 1. Öffnungstag war in allen Anwelkstufen die PA der mit MSB und Melasse behandelten Silagen geringer die der unbehandelten Kontrollsilagen, die höhere pH-Werte aufwiesen. Diese Tendenz setzte sich mit einigen Ausnahmen bei allen Öffnungsterminen fort. Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass auch bei der Verwendung der PA als Parameter die Aussagen des modifizierten RFT bestätigt wurden, wonach durch geeignete Silierzusätze (MSB und Melasse), die eine schnellere und tiefere pH-Wert-Absenkung hervorrufen, der Proteinabbau gehemmt wurde. Außerdem wurde nachgewiesen, dass mit steigendem Anwelkgrad und damit höherer Osmolalität die PA reduziert wurde, da bis auf wenige Ausnahmen der Presssaft der Frischsilagen die größte Menge an α-Amino-N aus der TPL freisetzte.

#### 4.2.3.4 Einfluss sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe auf den Proteinabbau

Zur Validierung der Ergebnisse aus den in-vitro Untersuchungen mit Zusatz von Tanninen wurden Mischmodellsilagen aus Luzerne und Hornklee hergestellt. Das Mischverhältnis war 2:1 bezogen auf die Frischmasse. Zusätzlich wurde Luzerne mit Rotklee im analogen Verhältnis gemischt und einsiliert. Neben der unbehandelten Kontrolle erfolgte jeweils der Zusatz von MSB ( $3 \cdot 10^5$  KbE/g FM) und Melasse (40 g/kg FM). Zum Vergleich dienten reine Luzernemodellsilagen mit gleicher Behandlung. Die Silierdauer betrug 48 Tage. Erwartet wurden Einflüsse zum einen des Rotklee durch Herabsetzung der Aktivität der proteolytischen Enzyme (PPO-Wirkung) und zum anderen des Hornklee wegen der Bindung der Proteine aufgrund der darin enthaltenen Tannine. Während die PPO-Gehalte im Rotklee nicht bestimmt werden konnten, d.h. die Wirkung unterstellt wurde, wurden im Hornklee die Gesamtphenole, die Nicht-Tannin-Phenole und die kondensierten Tannine sowie die Tanninfraktionen Tannin-Phenole und hydrolysierbare Tannine, die sich durch Differenzbildung ergeben, ermittelt (Tabelle 4.47).

Tabelle 4.47: Charakterisierung von Hornklee (zur Herstellung von Mischmodellsilagen mit Luzerne)

<b>Ausgangsmaterial für die Presssaftgewinnung</b>					
TS [%]	Gesamt-N [% d. TS]	Gesamt- phenole	Tanninfraktion [% der TS]		
			Tannin- Phenole	Hydrolysierbare Tannine	Kondensierte Tannine
20,14	3,54	7,80	3,48	1,33	2,15
<b>Presssaft</b>					
TSPS [%]	Stickstofffraktionen [% der TSPS]			PA (mg freig. $\alpha$ -Amino-N aus TPL/g Gesamt-N im PS)	
	Gesamt-N	fr. AS-N	NH <sub>3</sub> -N		
7,91	1,85	0,49	0,05	148,73	

Der Hornklee wies einen um ca. 1 % höheren Gesamt-N-Gehalt im Vergleich zur eingesetzten Luzerne auf (siehe Tabelle 4.48, Seite 94). Bezogen auf die TS im PS waren jedoch der Gesamt-N-Gehalt und auch der Anteil des freien AS-N am Gesamt-N im PS mit 26 % vergleichsweise sehr niedrig. Auch die PA lag auf dem niedrigen Niveau vergleichbar mit den Werten der untersuchten Rotkleearten (siehe Tabelle 4.27, Seite 67).

In Tabelle 4.48 sind ausgewählte Parameter der Ausgangsmaterialien für die Silagen angegeben.

Tabelle 4.48: TS- und Gesamt-N-Gehalt der Ausgangsmaterialien zur Bereitung der Silagen (Luzerne- und Mischmodellsilagen) (n=3)

<b>Ausgangsmaterial zur Herstellung der Vergleichs- und der Mischsilagen</b>		
Luzerne (Erntetermin 19.08.2004)	Luzerne/Rotklee	Luzerne/Hornklee
<b>TS [%]</b>		
<sup>b</sup> 17,93 ±0,18	<sup>c</sup> 17,18 ±0,15	<sup>a</sup> 18,78 ±0,30
<b>Gesamt-N [% der TS]</b>		
<sup>b</sup> 2,54 ±0,10	<sup>b</sup> 2,72 ±0,14	<sup>a</sup> 2,92 ±0,03

<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Zeile für p<0,05

Durch den Zusatz von Rotklee und Hornklee erhöhten sich die Gesamt-N-Gehalte der Ausgangsmaterialien zur Silierung. Die Proteolyse und die Desmolyse wurden anhand ausgewählter N-Fractionen in den nach 48 Tage geöffneten Modellsilagen und den daraus gewonnenen Presssäften bewertet (Tabelle 4.49).

Tabelle 4.49: Vergleich des TS-Gehaltes und des Gehaltes ausgewählter N-Fractionen in Ausgangsmaterial und Presssaft von Luzerne- und Mischsilagen ohne und mit Behandlung (n=3)

Behandlung*	Luzerne- und Mischsilagen nach 48d Silierdauer					
	Luzerne		Luzerne/Rotklee		Luzerne/Hornklee	
Ausgangsmaterial für die Presssaftgewinnung						
TS [%]						
ohne	19,05	±0,83	18,62	±0,91	18,20	±0,41
mit	19,67	±0,22	19,16	±0,98	20,23	±0,25
Gesamt-N [% der TS]						
ohne	<sup>c</sup> 2,35	±0,10	<sup>b</sup> 2,61	±0,11	<sup>a</sup> 2,94	±0,07
mit	<sup>c</sup> 2,55	±0,03	<sup>b</sup> 2,70	±0,04	<sup>a</sup> 2,91	±0,06
Presssaft						
TSPS [%]						
ohne	<sup>b</sup> 5,05	±0,15	<sup>b</sup> 5,29	±0,17	<sup>a</sup> 6,32	±0,21
mit	<sup>b</sup> 7,00	±0,37	<sup>b</sup> 7,25	±0,13	<sup>a</sup> 8,53	±0,20
Gesamt-N [% der TSPS]						
ohne	<sup>a</sup> 4,75	±0,08	<sup>b</sup> 4,29	±0,12	<sup>b</sup> 4,41	±0,02
mit	<sup>a</sup> 4,11	±0,07	<sup>c</sup> 3,60	±0,08	<sup>b</sup> 3,87	±0,10
freier Aminosäurenstickstoff [% der TSPS]						
ohne	<sup>a</sup> 2,39	±0,06	<sup>b</sup> 2,04	±0,10	<sup>b</sup> 2,15	±0,04
mit	<sup>a</sup> 1,51	±0,02	<sup>b</sup> 1,34	±0,02	<sup>a</sup> 1,46	±0,04
Ammoniakstickstoff [% der TSPS]						
ohne	<sup>a</sup> 0,79	±0,01	<sup>c</sup> 0,45	±0,04	<sup>b</sup> 0,66	±0,01
mit	0,23	±0,02	0,18	±0,01	0,20	±0,00

<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Zeile für p<0,05

\* mit: Milchsäurebakterien (3·10<sup>5</sup> KBE/g FM) und Melasse (40g/kg FM)

Der Hornkleezusatz führte zu einer signifikanten Erhöhung des TS-Gehaltes im PS bei gleichem TS-Gehalt des Pflanzenmaterials sowohl bei unbehandelten als auch bei den behandelten Silagen.

Der Vergleich der **unbehandelten** Silagen untereinander zeigte, dass sich sowohl die Luzerne/Rotkleemischsilagen als auch die Luzerne/Hornkleemischsilagen durch signifikant niedrigere Gesamt-N-Gehalte im PS im Vergleich zu den reinen Luzernesilagen bei höheren Gesamt-N-Gehalten des Ausgangsmaterials für die Presssaftgewinnung auszeichneten. Die niedrigsten freien AS-N- und  $\text{NH}_3$ -N-Gehalte im PS wiesen die Luzerne/Rotkleemischsilagen auf, jedoch lagen die Gehalte der Luzerne/Hornkleemischsilagen auch signifikant unter denen der reinen Luzernesilagen. Bei den **behandelten** Silagen ergab sich hinsichtlich der Gesamt-N- und der freien AS-N-Gehalte im PS ein analoges Bild, wobei es bei den  $\text{NH}_3$ -N-Gehalten keine statistisch gesicherten Unterschiede gab.

Bei den Anteilen des freien AS-N und des  $\text{NH}_3$ -N am Gesamt-N im PS ergaben sich signifikante Unterschiede (Tabelle 4.50).

Tabelle 4.50: Vergleich der Anteile des freien Aminosäurenstickstoff und Ammoniakstickstoff am Gesamt-N im Presssaft (PS) von Luzerne- und Mischsilagen ohne und mit Behandlung (n=3)

Anteil von freiem Aminosäurenstickstoff und Ammoniakstickstoff am Gesamt-N in Presssäften von Luzerne- und Mischsilagen			
Behandlung*	Luzerne	Luzerne/Rotklee	Luzerne/Hornklee
<b>Anteil freier Aminosäurenstickstoff am Gesamt-N im PS [%]</b>			
ohne	<sup>Aa</sup> 50,4 ± 0,7	<sup>Ab</sup> 47,5 ± 0,9	<sup>Ab</sup> 48,7 ± 0,8
mit	<sup>B</sup> 36,7 ± 0,5	<sup>B</sup> 37,1 ± 0,9	<sup>B</sup> 37,6 ± 1,03
<b>Anteil Ammoniakstickstoff am Gesamt-N im PS [%]</b>			
ohne	<sup>Aa</sup> 16,6 ± 0,1	<sup>Ac</sup> 10,6 ± 0,7	<sup>Ab</sup> 14,9 ± 0,1
mit	<sup>B</sup> 5,6 ± 0,4	<sup>B</sup> 5,1 ± 0,1	<sup>B</sup> 5,2 ± 0,2

<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Zeile für p<0,05

<sup>A,B</sup> Unterschiedliche Großbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte je N-Fraktion für p<0,05

\* mit: Milchsäurebakterien ( $3 \cdot 10^5$  KBE/g FM) und Melasse (40g/kg FM)

Der Vergleich der unbehandelten Silagen zeigte, dass die Anteile des freien Aminosäurenstickstoffs und des Ammoniakstickstoffs am Gesamt-N im PS der Mischmodellsilagen im Vergleich zu den reinen Luzernesilagen signifikant niedriger waren. Daraus wurde ersichtlich, dass die Proteolyse und die Desmolyse in den Mischsilagen im Vergleich zu den Luzernesilagen reduziert waren. Zudem lagen in den Luzerne/Rotkleemischsilagen der Anteil des Ammoniakstickstoffs am Gesamt-N im PS und

damit die Desmolyse signifikant niedriger als in den Luzerne/Hornkleemischsilagen. Durch die Behandlung des Pflanzenmaterials mit MSB und Melasse wurden die Anteile bei allen drei Silagearten signifikant reduziert, d.h. die proteolytischen und die desmolytischen Prozesse waren geringer. Zwischen den behandelten Silagearten gab es keine Unterschiede. Demzufolge war der Einfluss der Behandlung wesentlich größer als der der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe. Die zugesetzten Milchsäurebakterien in Kombination mit einer Gärsubstratquelle führten vermutlich zu einem rapiden pH-Wert-Abfall, so dass die proteinschützenden Eigenschaften der Tannine und der PPO keine Wirkung zeigen konnten. Läuft jedoch die Fermentation langsam ab, d.h. ohne Silierzusätze, kann der Proteinabbau wahrscheinlich zunächst in der Anfangsphase vor dem pH-Wert-Abfall in großem Ausmaß stattfinden. Durch die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe kann dann eine Verringerung des Proteinabbaus herbeigeführt werden. Generell konnten somit die Aussagen der in-vitro Versuche bestätigt werden, wonach ein Zusatz von Tanninen zu unbehandeltem Pflanzenmaterial zur Verringerung des Proteinabbaus führte. Auch die Wirkung der PPO, die durch die Beimischung von Rotklee erwartet wurde, konnte den Proteinabbau in den unbehandelten Modellsilagen reduzieren.

#### 4.2.3.5 Schlussfolgerungen

Die durch die in-vitro Untersuchungen erzielten und die daraus gezogenen Schlussfolgerungen wurden durch die zur Validierung durchgeführten Untersuchungen mit den Modellsilagen generell bestätigt.

Durch die Silierung mit und ohne MSB und Melasse war eine Differenzierung in den pH-Werten der Silagen erreicht worden, die die Proteolyse, die Desmolyse und die proteolytische Aktivität so beeinflussten, wie es nach den in-vitro Untersuchungen zu erwarten war. Je früher und je tiefer der pH-Wert abfiel, desto geringer waren die proteolytische Aktivität, die Proteolyse und die Desmolyse.

Die in engem Zusammenhang stehenden Einflussgrößen Osmolalität und Anwelkgrad beeinflussten das Ausmaß der proteolytischen Aktivität in gleicher Weise. Je höher die Osmolalität und der Anwelkgrad in den Modellsilagen waren, desto niedriger war die proteolytische Aktivität.

Die in den in-vitro Untersuchungen getroffene Aussage, dass Tanninzusätze als sekundärer Inhaltsstoff den Proteinabbau hemmen, konnte durch die Herstellung von Mischsilagen aus

Luzerne und Hornklee im Vergleich zu reiner Luzernesilage eindeutig bestätigt werden. Als weiterer sekundärer Pflanzeninhaltsstoff wurde die Wirkung von Polyphenoloxidasen (PPO) durch Herstellung von Mischsilagen aus Luzerne und Rotklee untersucht. Die im Hornklee enthaltenen Tannine und die im Rotklee enthaltenen PPO bewirkten in den Mischsilagen eine deutliche Reduzierung des Proteinabbaus. Da vor allem die Mischsilagen aus Luzerne und Rotklee einen deutlich reduzierten Proteinabbau aufwiesen, kann eventuell eine Mischaussaat von Luzerne und Rotklee ein optimales Ausgangsprodukt für qualitativ hochwertige Silagen darstellen. Durch den Zusatz von geeigneten Siliermitteln (MSB und Melasse) wurde der proteinschützende Effekt der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe allerdings durch den vermutlich schnell herbeigeführten pH-Wert-Abfall im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollsilagen überlagert.



## 5 Diskussion

### 5.1 Verwendbarkeit des Presssaftes als repräsentatives Medium zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität und zur Quantifizierung ausgewählter Stickstofffraktionen

Als Substrat zur Charakterisierung des Proteinabbaus sowie zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität wurde der Presssaft aus unsiliertem und siliertem Pflanzenmaterial verwendet. Für die Gewinnung einer repräsentativen Probe der wässrigen Phase dieser Pflanzenmaterialien wird vorausgesetzt, dass die Zusammensetzung des Presssaftes bei jedem Abpressvorgang gleich ist. Technische Faktoren, die die Presssaftmenge und -zusammensetzung beeinflussen können, sind die Pressdauer und der Pressdruck. Der Pressvorgang wurde standardisiert nach 2 Minuten beendet. Diese Pressdauer wurde auch von HEIER (1983) als ausreichend eingestuft, da der Saftaustritt bei dessen Untersuchungen an Gras nach dieser Zeit unabhängig vom Pressdruck zum Erliegen kam. Als minimal nötigen Pressdruck gibt GREENHILL (1964a) 70  $\text{kp/cm}^2$  an, so dass die in den eigenen Untersuchungen verwendeten 100  $\text{kp/cm}^2$  zur Presssaftgewinnung geeignet sind. Die vorliegenden Ergebnisse aus dem Vergleich von Presssäften, die mit zwei unterschiedlichen Druckstufen (60 und 120  $\text{kp/cm}^2$ ) gewonnen wurden, zeigten, dass der Pressdruck keinen Einfluss auf den TS-Gehalt der Presssäfte und den Gehalt der analysierten Stickstofffraktionen sowohl im Presssaft als auch im Presskuchen hatte (siehe Tabelle 4.12, Seite 47 und Tabelle 4.14, Seite 52). Damit werden die Aussagen von GREENHILL (1964a) erweitert, der bei acht verschiedenen Druckstufen (35 bis 280  $\text{kp/cm}^2$ ) keine Veränderung der kolligativen Eigenschaften von Presssäften aus Weidelgras, Weißklee und Luzerne feststellte. Es sind demzufolge nicht nur jene Eigenschaften des Presssaftes, die nur von der Teilchenzahl, nicht aber von der Art der Teilchen oder deren chemischen Zusammensetzung abhängen, vom Pressdruck unabhängig wie z.B. die Osmolalität (HOEDTKE, 2008), sondern auch der Gehalt der Inhaltsstoffe des Presssaftes selbst. In Relation zum Ausgangsmaterial zeigte sich eine gesicherte Abhängigkeit der TS-Gehalte der Presssäfte von den TS-Gehalten des Pressgutes (siehe Abbildung 4.2, Seite 49). Jedoch war bei identischem TS-Gehalt von unsiliertem und siliertem Ausgangsmaterial sowohl der TS-Gehalt des Presssaftes als auch die Presssaftmenge aus dem silierten Pressgut höher (siehe Gleichungen 1 und 2, Seite 48 und Gleichungen 3 und 4, Seite 49). Dieser Zusammenhang ist auch aus den Ergebnissen von KOSCHUH *et al.* (2003) zu erkennen. Sie zeigten, dass aus siliertem Material eine größere TS-Menge über den Presssaft gewonnen werden kann als aus Grüngut mit gleichem TS-

Gehalt. In Silagen liegt demnach ein größerer Anteil der Inhaltsstoffe in der wässrigen Phase vor, die mittels des Presssaftes gewonnen wird. Demzufolge wird durch den Zellzusammenbruch, der durch den Silierprozess herbeigeführt wird (GREENHILL 1964a; LYTTLETON 1973), die Gewinnung der wässrigen Phase als Presssaft erleichtert.

Die Zusammensetzung des Presssaftes ist daher nicht zufällig, sondern folgt einer Gesetzmäßigkeit. Die vorgestellten Regressionen sind mit Abwandlung der Parameter auch auf andere Pflanzenarten übertragbar (z.B. auf Ergebnisse von HEIER, 1983 und HOEDTKE, 2008). Der Presssaft gilt somit als repräsentative Probe der wässrigen Phase von Grünfütterleguminosen. Bei sehr TS-reichem Pflanzenmaterial sind jedoch der Presssaftgewinnung technische Grenzen gesetzt. Bei Untersuchungen von HOEDTKE (2008) hat sich gezeigt, dass die Herstellung eines Auszuges ein alternatives Verfahren für Pflanzenmaterialien mit einem TS-Gehalt  $> 40\%$  darstellte. Dabei wurde durch Wasserzugabe ein TS-Gehalt von  $20\%$  eingestellt. Nach einer Nacht im Kühlschrank bei  $4^{\circ}\text{C}$  erfolgte die Abpressung nach den gleichen Bedingungen wie bei der Presssaftgewinnung. HOEDTKE (2008) wies nach, dass sich die Osmolalitäten von Presssäften und Auszügen aus identischem Pflanzenmaterial nicht signifikant unterschieden. Es wird vermutet, dass sich die Auszugherstellung ebenfalls für die Bestimmung der proteolytischen Aktivität sowie für die Quantifizierung ausgewählter Stickstofffraktionen eignet.

## 5.2 Einschätzung des voraussichtlichen Proteinabbaus während der Silierung mittels im Presssaft analysierbarer Parameter und mit Hilfe des modifizierten Rostocker Fermentationstests

Da der Proteinabbau gegenüber den intakt bleibenden Proteinen abgegrenzt verlaufen muss, werden die abzubauenen Proteine in die Vacuolen aufgenommen. Dadurch steigt ihr Anteil in der flüssigen Phase an (LIBBERT, 1993). Auch alle weiteren Stoffumsetzungen während der Silierung, im speziellen die Bildung von Milchsäure durch die Mikroorganismen, sind an die wässrige Phase der Pflanzen gebunden (GREENHILL, 1964a). Als repräsentative Probe der wässrigen Phase ist der Presssaft demzufolge potentiell als Untersuchungsmedium vor der Silierung geeignet, um darin die Inhaltsstoffe und deren Wirkungen zu quantifizieren, die diese Prozesse beeinflussen können.

Unabhängig von den Bedingungen bei der Silierung ist das Ausmaß des Proteinabbaus zunächst abhängig von der proteolytischen Aktivität und der Abbauanfälligkeit des Proteins.

Es wurde nachgewiesen, dass im Presssaft proteinabbauende Enzymaktivitäten enthalten waren. Diese führten zu reproduzierbaren Ergebnissen bei der Anwendung der konzipierten in-vitro Methode. Dabei erfolgt keine Unterscheidung in pflanzliche und mikrobielle Herkunft der Enzymwirkung. Auch BRADY (1961), SINGH (1962), WELLS (1968), FREMERY *et al.* (1972) und FINLEY *et al.* (1980) quantifizierten im Presssaft bzw. im Extrakt aus Presssaft die proteolytische Aktivität von Grünfütterleguminosen (siehe Tabelle 2.6, Seite 26). Im Unterschied zu deren Vorgehensweise wird bei der konzipierten in-vitro Methode nicht mit einem tierischen, sondern mit einem pflanzlichen Testproteinpräparat gearbeitet. Die eigenen Untersuchungen haben gezeigt, dass das Testproteinpräparat pflanzlichen Ursprungs besser durch die Enzyme des Presssaftes abgebaut werden kann als das tierische (siehe Tabelle 4.9, Seite 43). Dieses Ergebnis bestätigt Untersuchungen von JONES *et al.* (1995a), die ebenfalls eine höhere Abbaurate von RubisCo im Vergleich zu BSA bei der Bestimmung der proteolytischen Aktivität von Luzerne und Rotklee feststellten. Jedoch verwendeten JONES *et al.* (1995a) wie auch andere Autoren (siehe Tabelle 2.6, Seite 26) zum Teil aufwändig hergestellte Extrakte der Pflanzenmaterialien, die sie nach Zugabe unterschiedlicher Lösungsmittel erhielten. Die Gewinnung des Presssaftes dagegen ist technisch einfach, so dass die konzipierte Methode in der Praxis angewendet werden kann.

Neben der proteolytischen Aktivität bestimmt die Abbauanfälligkeit des Proteins das zu erwartende Ausmaß des Proteinabbaus während der Silierung. Da nur das Protein angreifbar ist, welches in der wässrigen Phase vorliegt, kann der Presssaft als Untersuchungsmedium verwendet werden. Es ist davon auszugehen, dass in Anlehnung an das CNCPS (NRC, 2001) N-Verbindungen im Presssaft, die entweder in TCE löslich (Peptide) oder durch TCE fällbar (Reinprotein) sind, dem Proteinabbau während der Silierung unterliegen werden. In den eigenen Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Reinprotein-N-Bestimmung im Presssaft aufwändig und ungenau ist (Tabelle 4.6, Seite 40). Die Peptide als potentiell abbaubare N-Verbindungen wurden in Übereinstimmung mit WINTERS *et al.* (2002) nicht bei der  $\alpha$ -Amino-N-Bestimmung erfasst (siehe Kapitel 4.2.1.1, Seite 40). Weitere Analysemethoden konnten aus Kapazitätsgründen nicht eingesetzt werden. Daher wird praktikablerweise der Gesamt-N-Gehalt der Presssäfte als Parameter herangezogen, um im Siliergut die Abbauanfälligkeit des Proteins zu beurteilen.

Der Silierverlauf und damit die sich bildende Silagemikroflora beeinflusst das tatsächliche Ausmaß des Proteinabbaus während der Silierung. Das Anwelken wird als wirkungsvolle Methode zur Selektierung von Mikroorganismen angesehen, die eine erfolgreiche Konservierung durch die Bildung von Milchsäure herbeiführen (WIERINGA, 1958). Dies

beruht auf der Tatsache, dass z.B. Clostridien, die als Gärerschädlinge gelten und in schlechten Silagen hauptsächlich für den Proteinabbau verantwortlich sind (KEMBLE, 1956), eine geringere Osmotoleranz als die Milchsäurebakterien aufweisen (LINDGREN, 1991). Allgemein wird angenommen, dass die Trockensubstanz mit der Osmolalität korreliert (GREENHILL, 1964b). Bisher wurde die Osmolalität deshalb meist nicht direkt im Siliergut bestimmt, sondern lediglich über die Trockensubstanz geschätzt. Jedoch zeigten unter anderem Untersuchungen von DRIEHUIS und VAN WIKSELAAR (1996), dass es trotz eines hohen TS-Gehaltes zur Bildung von Buttersäure kam, welche auf die Aktivität von Clostridien zurückgeführt wurde. Diese Clostridien waren vermutlich nicht sehr osmotolerant. Anscheinend wiesen die untersuchten Pflanzen trotz eines hohen TS-Gehaltes nur geringe Osmolalitäten auf. Diese Diskrepanz zwischen Trockensubstanz und Osmolalität ist inzwischen bestätigt. Sie wird auf pflanzenspezifische Stoffwechselvorgänge zurückgeführt, die zu unterschiedlichen Osmolalitäten bei gleichen TS-Gehalten der Pflanzen führen können (HOEDTKE, 2008). Demzufolge ist die Osmolalität, welche im Presssaft einfach bestimmt werden kann (HOEDTKE, 2008), ein der TS-Bestimmung vorzuziehender Parameter für die Vorhersage der sich entwickelnden Silagemikroflora.

Neben der Osmolalität gilt im Hinblick auf die Reduzierung des Proteinabbaus während der Silierung die Gestaltung eines optimalen Silierverlaufes, d.h. ein schneller und ausreichend tiefer pH-Wert-Abfall (MCKERSIE, 1985; BOWLEY und MCKERSIE, 1987; SLOTTNER und BERTILSSON, 2006), als entscheidendes Kriterium. Durch einen schnellen pH-Wert Abfall wird zum einen die Aktivität pflanzlicher Enzyme reduziert (siehe Tabelle 2.5, Seite 19). Zum anderen wird die Zunahme der Anzahl von Enterobakterien, die sich gerade zu Beginn der Silierung entwickeln können, verhindert (LINDGREN *et al.*, 1985). Enterobakterien wirken ebenfalls desmolytisch. Sie sind insbesondere in Silagen mit einem langsamen pH-Wert-Abfall, in denen keine Clostridienaktivität nachgewiesen wurde, für hohe Ammoniakgehalte verantwortlich (SEALE *et al.*, 1986). Der Silierverlauf und damit der pH-Wert-Abfall werden vor allem durch die Pufferkapazität und den Gärsubstratgehalt des Siliergutes sowie durch die Silagemikroflora bestimmt. Diese Mikroflora bildet sich entweder aus dem natürlichen Epiphytenbesatz oder aus den zugesetzten Mikroorganismen, wobei es sich meistens um Milchsäurebakterien handelt. Mit Hilfe des Rostocker Fermentationstests kann die Silierfähigkeit von Pflanzenmaterialien untersucht werden, wodurch schnell Aussagen zu eventuell nötigen Silierzusätzen (Gärsubstrat, Milchsäurebakterien) und zum Siliererfolg getroffen werden können. Durch die Modifikation, die in der vorliegenden Arbeit durch die Bestimmung der  $\alpha$ -Amino-N-Gehalte in den Extrakten des Rostocker

Fermentationstests vorgenommen wurde (siehe 4.2.2.1, Seite 58), wird zusätzlich eine Einschätzung der Beeinflussbarkeit des Proteinabbaus während der Silierung ermöglicht. Die Wirkungen von Einflussfaktoren können sowohl getrennt als auch kombiniert unter Fermentationsbedingungen, d.h. mit sich verändernden Zusammensetzungen der Inkubationsmedien in Folge von Stoffumsetzungen, untersucht werden. Dies wird als entscheidender Vorteil gegenüber anderen statischen Methoden gesehen, die den Einfluss von Faktoren zwar belegen, jedoch keine Aussagen hinsichtlich ihrer Wirkungen unter Silierbedingungen zulassen.

### 5.3 Beurteilung der Proteinqualität von Silagen mit ausgewählten Stickstofffraktionen im Presssaft

Die Literatursauswertung zeigte, dass in wissenschaftlichen Arbeiten zur Bewertung der Proteinqualität von Silagen der Reinprotein-N bzw. der NPN herangezogen wird (siehe Tabelle 2.3, Seite 14 und Tabelle 2.4, Seite 16). Teilweise werden die Auswertungen mit dem Ammoniak-N ergänzt. In sehr seltenen Fällen wird der freie Aminosäurenstickstoff bestimmt. In der Silierpraxis erfolgt die Beurteilung der Gärqualität anhand des DLG-Schlüssels. In dem bis 2006 geltenden DLG-Schlüssel (WEISSBACH und HONIG, 1993) wurde der Ammoniakgehalt als Maß für die Bewertung der Proteinqualität der Silagen herangezogen. Nach dem neuen DLG-Schlüssel, der im Praxishandbuch Futterkonservierung (HERTWIG und BUNDESARBEITSKREIS FUTTERKONSERVIERUNG, 2006) veröffentlicht wurde, kann auf eine Bestimmung des Ammoniakgehaltes jedoch verzichtet werden. Hiernach wird das Ausmaß des Proteinabbaus hinreichend über den Buttersäuregehalt erfasst. Diese Vorgehensweise wird jedoch nach Auswertung der eigenen Ergebnisse angezweifelt. In den Modellsilagen fand der Proteinabbau zum Teil in großem Umfang statt, ohne dass Buttersäure nachgewiesen wurde (siehe Tabellen D.12 bis D.20 im Anhang). Darüber hinaus ist die alleinige Verwendung des Ammoniakgehaltes als Kriterium für den Proteinabbau nicht aussagefähig. In Silagen können intensive proteolytische Prozesse ablaufen, ohne dass dabei der Ammoniakgehalt signifikant ansteigt (MCDONALD *et al.*, 1991). Daher wird zur Beurteilung der Proteinqualität von Praxissilagen die Bestimmung geeigneter Stickstofffraktionen im Presssaft empfohlen, mit denen die Prozesse Proteolyse und Desmolyse beurteilt werden können.

Als Parameter zur Bewertung des Ausmaßes proteolytischer Prozesse diene der Anteil des freien Aminosäuren-N am Gesamt-N im Presssaft. Um die Aussagefähigkeit dieser Stickstofffraktion im Presssaft zu überprüfen, wurde die Beziehung zu dem traditionell verwendeten Anteil des Reinproteinstickstoffs am Gesamtstickstoff der Modellsilagen untersucht. Die Abhängigkeit des Anteils des freien Aminosäuren-N am Gesamt-N im PS (y in %) von dem Anteil des Reinprotein-N am Gesamt-N der Modellsilagen (x in %) lässt sich mit der folgenden linearen Gleichung eindeutig nachweisen:

$$y = 68,6^{***} - 0,5^{***} \cdot x \quad R^2=0,64 \quad s \pm 6,19 \quad p < 0,001 \quad (n=82) \quad (G 16)$$

Bei einer 10 %igen Abnahme des Anteils des Reinprotein-N am Gesamt-N der Modellsilagen steigt der Anteil des freien Aminosäuren-N am Gesamt-N im PS um 5 %. Die Beziehung zwischen diesen beiden N-Fractionen zeigt, dass mittels der Analyse im Presssaft eine Beurteilung der Proteinqualität der Silagen möglich ist und somit auf die aufwändige und häufig ungenaue Reinprotein-N-Bestimmung verzichtet werden kann. Die Peptide als weitere mögliche Abbauprodukte der Proteolyse werden bei der Nutzung des freien Aminosäurenstickstoffs nicht berücksichtigt. Da es Hinweise auf eine effektivere Verwertung der Peptide durch die Pansenmikroben im Vergleich zu den korrespondierenden freien Aminosäuren und Ammoniak gibt (CRUZ SOTO *et al.*, 1994), dienen die Peptide nicht als Parameter für den negativ zu bewertenden Proteinabbau während der Silierung. Zur Quantifizierung der Desmolyse wird der Ammoniak-N im Presssaft verwendet, wobei bei der Beurteilung beachtet werden muss, dass diese N-Fraktion zwar hauptsächlich bei der Desaminierung der Aminosäuren gebildet wird, jedoch auch aus der hydrolytischen Spaltung der beiden Säureamide Asparagin und Glutamin stammen kann (KEMBLE, 1956; MACPHERSON und SLATER, 1959). Ein weiterer Abbauweg der Aminosäuren (Decarboxylierung) bleibt mit diesem Bewertungskriterium ebenfalls unberücksichtigt.

Zur weiteren Bewertung der Silagequalität können darüber hinaus im Presssaft der Silagen der pH-Wert und die Osmolalität gemessen werden. Die Analyse der Gärssäuren mit der HPLC bzw. mit der GC ist vermutlich ebenfalls möglich, wobei wahrscheinlich vor allem die Presssaftaufbereitung zu modifizieren ist.

Damit ist der Presssaft ein universell einsetzbares Untersuchungsmedium, in dem schnell und einfach wichtige Parameter zur Qualitätsbeurteilung von Silagen erfasst werden können.

#### 5.4 Aussagefähigkeit der Ergebnisse aus den in-vitro Untersuchungen und Validierung der Aussagen mit Hilfe der Stickstofffraktionen im Presssaft von Modellsilagen

Erwartungsgemäß konnten mit den beiden in-vitro Methoden (Bestimmung der proteolytischen Aktivität und modifizierter RFT) die Wirkungen von Einflussfaktoren auf das zu erwartende Ausmaß des Proteinabbaus während der Silierung untersucht werden.

Mit Hilfe des modifizierten RFT wurde der reduzierende Einfluss des Anwelkens auf das Ausmaß des Proteinabbaus während der Fermentation durch Einstellung unterschiedlicher Osmolalitäten in den wässrigen Aufgüssen eindeutig nachgewiesen (Kapitel 4.2.2.1.2, Seite 60). Auch die proteolytische Aktivität (y in freigesetzter  $\alpha$ -Amino-N aus TPL/g Gesamt-N im PS) im Presssaft sowohl von unsiliierter Luzerne als auch von unsiliertem Klee gras sank linear mit steigendem Anwelkgrad (x in % TS):

$$\text{Luzerne: } y = 459^{***} - 11,1^{***} \cdot x \quad R^2=0,87 \quad s \pm 25,1 \quad p < 0,001 \quad (n=12) \quad (\text{G } 17)$$

$$\text{Klee gras: } y = 189^* - 2,6^* \cdot x \quad R^2=0,96 \quad s \pm 6,2 \quad p < 0,05 \quad (n=4) \quad (\text{G } 18)$$

Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu Aussagen von MCKERSIE und BUCHANAN-SMITH (1982), die keinen signifikanten Einfluss des Anwelkens auf die proteolytische Aktivität feststellten. Da die Autoren jedoch die Enzymaktivitätsbestimmung in einem mit organischen Lösungsmitteln hergestellten Extrakt durchführten, könnte diese Diskrepanz methodische Ursachen haben. Vorstellbar ist die Überlagerung des Osmolalitätseffektes der verschiedenen angewelkten Pflanzenmaterialien durch die zugegebenen Lösungen und Puffer bei der Extrakterstellung. Der Presssaft wies im Gegensatz dazu in Abhängigkeit vom Anwelkgrad verschiedene Osmolalitäten auf (siehe Tabelle D.11 im Anhang), welche in der konzipierten in-vitro Methode die Höhe der proteolytischen Aktivität beeinflussten. Die sinkende proteolytische Aktivität mit steigendem Anwelkgrad ist zudem ein plausibles Ergebnis. Mit abnehmender Wasserverfügbarkeit wird der Prozess der Proteinhydrolyse verlangsamt (SLOTTNER und BERTILSSON, 2006). Demzufolge wird für die aus den verschiedenen angewelkten Pflanzenmaterialien hergestellten Silagen eine Abnahme des Proteinabbaus mit zunehmendem Anwelkgrad prognostiziert.

Jedoch kann die Wirkung der Osmolalitätserhöhung nicht unabhängig von der des pH-Wertes betrachtet werden. Ein niedriger pH-Wert wirkt dabei nicht nur selektierend auf die Silagemikroben, indem z.B. die säureintoleranten Clostridien und Enterobakterien, die als Hauptverursacher der Desmolyse gelten, inhibiert werden (MCDONALD *et al.*, 1991), sondern er reduziert auch die Aktivität der pflanzlichen Enzyme (siehe Tabelle 2.5, Seite 19).

Aus den in-vitro Untersuchungen mit dem modifizierten RFT (Kapitel 4.2.2.1.1, Seite 59) wurde abgeleitet, dass der Proteinabbau während der Fermentation durch sinkende pH-Werte reduziert wurde. Diese Tatsache ist allgemein bekannt und wird bei der Silierung durch die Zugabe von Säuren oder den Einsatz von MSB zur Initialisierung eines schnellen pH-Wert-Abfalls realisiert (z.B. HENDERSON und MCDONALD, 1971; BARRY *et al.*, 1978b; CARPINTERO *et al.*, 1979; CHAMBERLAIN *et al.*, 1982; JONES *et al.*, 1992; VAGNONI *et al.*, 1997; DAVIES *et al.*, 1998; WINTERS *et al.*, 2001; SPEIJERS *et al.*, 2002). Auch in den eigenen in-vitro Untersuchungen mit dem modifizierten RFT führten geeignete Silierzusätze zu einem schnelleren pH-Wert-Abfall verbunden mit einem minimierten Proteinabbau (Kapitel 4.2.2.1.6, Seite 64). Es wurde ebenfalls deutlich, dass die verwendete Luzerne einen für eine ausreichend tiefe Ansäuerung zu niedrigen Gärsubstratgehalt aufwies. Die zugesetzten Milchsäurebakterien bewirkten weder ein schnelles Absinken der pH-Werte noch die Reduzierung des Proteinabbaus im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Erst mit dem Zusatz von Zucker sank der pH-Wert in den Aufgüssen des modifizierten RFT deutlich tiefer, womit die Reduzierung des Proteinabbaus erklärt wird. Der nur 3,0 %ige WLK-Gehalt der Luzerne ließ dieses Ansäuerungsverhalten erwarten. Da mittels des RFT auch ohne diese vorherige Analyse diese Erwartungen bestätigt wurden, kann demzufolge in der Silierpraxis zur Vorhersage der Silierfähigkeit auf die Bestimmung der WLK verzichtet werden.

In den hergestellten Modellsilagen zeigte auch die proteolytische Aktivität die prognostizierten Reaktionen (siehe Tabelle 4.46, Seite 92). Die Abhängigkeit der proteolytischen Aktivität ( $y$  in mg freigesetzter  $\alpha$ -Amino-N aus der TPL/g Gesamt-N im PS) von dem pH-Wert im PS ( $x$ ) der Luzernesilagen (Frisch, Anwelk1, Anwelk2) zeigt folgende Regression:

$$y = -175^{***} + 58,8^{***} \cdot x \quad R^2=0,68 \quad s \pm 32,5 \quad p < 0,001 \quad (n=126) \quad (G 19)$$

Die proteolytische Aktivität nahm mit fallenden pH-Werten in der Weise ab, dass der Wert um 59 mg freigesetzten  $\alpha$ -Amino-N aus TPL/g Gesamt-N im PS sank, wenn der pH-Wert im Presssaft um eine Einheit reduziert wurde. Die Abhängigkeit der proteolytischen Aktivität ( $y$  in mg freigesetzter  $\alpha$ -Amino-N aus der TPL/g Gesamt-N im PS) von der Osmolalität ( $x$  in mosmol/kg PS) war ebenfalls eindeutig:

$$y = 214^{***} - 0,14^{***} \cdot x \quad R^2=0,41 \quad s \pm 44,1 \quad p < 0,001 \quad (n=126) \quad (G 20)$$

Durch die gesicherte Regression konnte der hemmende Einfluss hoher Osmolalitäten auf die proteolytische Aktivität nachgewiesen werden. Die Erhöhung der Osmolalität um 100



mosmol reduzierte den Wert um 14 mg freigesetzten  $\alpha$ -Amino-N aus TPL/g Gesamt-N im PS. Da allerdings von einer Kombination der Wirkungen beider Faktoren auf die proteolytische Aktivität ausgegangen werden muss, erfolgte eine mehrfachregressive Auswertung der Wirkung der beiden Faktoren pH-Wert ( $x_1$ ) und Osmolalität ( $x_2$  in mosmol/kg PS) auf die proteolytische Aktivität ( $y$  in mg freigesetzter  $\alpha$ -Amino-N/g Gesamt-N im PS):

$$y = -72,7^* + 48,4^{***} \cdot x_1 - 0,06^{***} \cdot x_2 \quad R^2=0,73 \quad s\pm 30,1 \quad p<0,001 \quad (n=126) \quad (G 21)$$

Obwohl das absolute Glied statistisch gesichert ist, erfolgt zur besseren Einschätzung der Einzelfaktorenwirkung die Aufteilung des Absolutgliedes, wodurch die Aussagefähigkeit der Regressionsgleichungen allerdings eingeschränkt wird:

$$y = 38,3^{***} \cdot x_1 - 0,09^{***} \cdot x_2 \quad s\pm 30,9. \quad (G 22)$$

Hinsichtlich der Wirkungsrichtung der Einzelfaktoren (Vorzeichen der Regressionsglieder) wurden die Aussagen der Regressionsgleichung aus den in-vitro Untersuchungen mit dem modifizierten RFT gesichert bestätigt (Tabelle 4.21, Seite 61). Auch mit der Bestimmung der proteolytischen Aktivität ist abzuleiten, dass der pH-Wert die Höhe der Werte stärker beeinflusst als die Osmolalität (F-Werte: pH-Wert 491, Osmolalität 158). Durch diese Ergebnisse wird die allgemein anerkannte Tatsache bestätigt, wonach der pH-Wert den größten Einfluss auf den Proteinabbau ausübt (BOWLEY und MCKERSIE, 1987). Damit sind sowohl der modifizierte RFT als auch die konzipierte Methode zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität in Presssäften geeignet, Wirkungen von Faktoren auf den Proteinabbau unter in-vitro Bedingungen zu untersuchen. Es wird davon ausgegangen, dass die mit beiden in-vitro Verfahren erhaltenen Aussagen für die Silierpraxis anwendbar sind.

Im Hinblick auf das zur Hemmung des Proteinabbaus während der Silierung notwendige Ansäuerungsmaß wurde ein pH-Wert von 4,0 mit dem modifizierten RFT als Kriterium festgelegt. Mit steigender Osmolalität führte jedoch auch ein pH-Wert von 4,4 zu einer vergleichbaren Reduzierung (siehe Tabelle 4.21, Seite 61). Diese Ergebnisse stimmen mit dem in der Silierpraxis allgemein anerkannten trockensubstanzabhängigen kritischen pH-Wert von WEISSBACH *et al.* (1974) überein. Demnach steigt der für eine stabile Silage erforderliche pH-Wert mit steigender Trockensubstanz an. Die Aussagefähigkeit des modifizierten RFT wird wiederum bekräftigt.

Durch die eigenen Ergebnisse aus den Versuchen mit den Modellsilagen wurden die Einschätzungen hinsichtlich der pH-Wert- und Osmolalitätswirkungen nach den in-vitro

Untersuchungen zusätzlich bestätigt. So führte das Anwelken ebenfalls zu einer Reduzierung des Proteinabbaus wie der Zusatz von geeigneten Silierzusätzen (Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1: Beeinflussung der Anteile von freiem Aminosäurenstickstoff (fr. AS-N) und Ammoniakstickstoff (NH<sub>3</sub>-N) am Gesamtstickstoff (Gesamt-N) im Presssaft (PS) durch Anwelkgrad und Behandlung von Luzernesilagen während einer Lagerung von 96 Tagen (n=21)

Anwelkstufe	Behandlung*	Anteil am Gesamt-N im PS [%]	
		fr. AS-N	NH <sub>3</sub> -N
Frisch (14 % TS)	0	<sup>Aa</sup> 62,7 ± 8,2	<sup>Aa</sup> 13,5 ± 4,3
	1	<sup>Cb</sup> 50,0 ± 7,6	<sup>BCb</sup> 9,5 ± 2,3
	2	<sup>Dc</sup> 44,7 ± 4,9	<sup>DEc</sup> 7,9 ± 1,3
Anwelk1 (21 % TS)	0	<sup>Ba</sup> 54,8 ± 10,9	<sup>Ba</sup> 10,9 ± 3,1
	2	<sup>DEb</sup> 42,7 ± 8,6	<sup>GFb</sup> 6,2 ± 1,1
Anwelk2 (23 % TS)	0	<sup>Ea</sup> 38,4 ± 7,3	<sup>DEa</sup> 8,0 ± 2,2
	2	<sup>Fb</sup> 32,8 ± 6,6	<sup>Gb</sup> 4,9 ± 0,9
Anwelk3 (28 % TS)	0	<sup>CD</sup> 46,5 ± 8,1	<sup>CDa</sup> 8,3 ± 2,2
	3	<sup>CD</sup> 45,3 ± 5,0	<sup>EFb</sup> 6,7 ± 1,4

\* 0: ohne, 1: Melasse, 2: Milchsäurebakterien und Melasse, 3: Milchsäurebakterien

<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede je Anwelkstufe in einer Spalte für p<0,05

<sup>A,B</sup> Unterschiedliche Großbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede in einer Spalte für p<0,05

Es ist eindeutig, dass sich das Anwelken des einzusilierenden Pflanzenmaterials reduzierend auf den Proteinabbau auswirkt. Im Vergleich zu den Frischsilagen liegen in den vergleichbaren Silagen aller Anwelkstufen sowohl der Anteil des freien Aminosäurenstickstoffs als auch der Anteil des Ammoniakstickstoffs am Gesamtstickstoff im Presssaft signifikant tiefer. Einen ebenfalls geringeren Anteil des NPN am Gesamt-N in unbehandelten Anwelksilagen aus Luzerne im Vergleich zu identischen Frischsilagen analysierten SUTTON und VETTER (1971), MCKERSIE und BUCHANAN-SMITH (1982) und CAVALLARIN *et al.* (2000). Bei der Auswertung der eigenen Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass die unbehandelten Anwelk2-Silagen einen niedrigeren Anteil des freien Aminosäurenstickstoffs am Gesamt-N im Presssaft aufwiesen als die Anwelk3-Silagen. Dies war über die gesamte Versuchsdauer hinweg zu erkennen (siehe Tabelle D.21 im Anhang). Der verlangsamte pH-Wert-Abfall bei der Silierung der höher angewelkten Luzerne (siehe Tabelle 4.39, Seite 80 und Tabelle 4.41, Seite 85) führte vermutlich zu einer späteren Inhibierung der proteolytischen Enzyme. Die Desmolyse scheint stärker durch den Zusatz von Milchsäurebakterien beeinflusst zu werden als durch das Anwelken. Der Anteil des

Ammoniakstickstoffs am Gesamtstickstoff im Presssaft unterschied sich nicht signifikant zwischen den unbehandelten Anwelk2- und Anwelk3-Silagen. In den unbehandelten Anwelk3-Silagen haben sich vermutlich Enterobakterien zu Beginn der nur langsam einsetzenden Fermentation vermehrt, die zu der verstärkten Desmolyse beigetragen haben.

Bei den Frisch- bis Anwelk2-Silagen wurde sowohl der Anteil des freien Aminosäurenstickstoffs als auch der des  $\text{NH}_3\text{-N}$  am Gesamt-N im Presssaft über den gesamten Lagerzeitraum hinweg im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle durch die Silierzusätze signifikant reduziert. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den Aussagen von CARPINTERO *et al.* (1979), die durch Zusatz von Milchsäurebakterien und Zucker zu frischem Klee gras den Proteinabbau, den sie anhand der Bildung von NPN charakterisierten, um 14 % minimieren konnten. Bei den Modellsilagen aus der höchstangewelkten Luzerne (Anwelk3) wurde der Anteil des freien Aminosäurenstickstoff am Gesamt-N im Presssaft nur tendenziell durch den Zusatz von Milchsäurebakterien vermindert, während der  $\text{NH}_3\text{-N}$ -Anteil auch signifikant niedriger lag als in der unbehandelten Kontrolle. Untersuchungen von GRUM *et al.* (1991) mit angewelkter Luzerne (40 % TS) zeigten, dass auch der alleinige Zusatz von Glucose keine positiven Effekte hinsichtlich eines reduzierten Proteinabbaus in den Silagen bewirkte. Da in den eigenen Untersuchungen Milchsäurebakterien als einziger Zusatz zu der bis auf 28 % TS angewelkten Luzerne (Anwelk3) nur auf die Desmolyse einen signifikanten Einfluss hatten, wird für die Anwendung in der Praxis bei der Silierung von hochangewelkter Luzerne daher eine Behandlung aus der Kombination beider Zusätze empfohlen. Ein weiterer hinsichtlich der Minimierung des Proteinabbaus positiver Effekt des Melassezusatzes ist die dadurch hervorgerufene Erhöhung der Osmolalität. Neben der Bereitstellung von Gärsubstrat zur Verbesserung des Silierverlaufes kann dadurch auch die proteolytische Aktivität selbst reduziert werden.

Eine weitere Übereinstimmung mit den Literaturangaben (MCKERSIE, 1985) erbrachte die Auswertung der Kinetik des Proteinabbaus. Während der 96-tägigen Fermentation in Modellsilagen liefen sowohl Proteolyse als auch Desmolyse ab. Die Höhe der Anteile der diese Prozesse charakterisierenden N-Verbindungen am Gesamt-N im Presssaft folgte dabei logarithmischen Funktionen (Tabelle 5.2), so dass die Prozesse eindeutig beschreibbar werden.

Tabelle 5.2: Abhängigkeit der Anteile des freien Aminosäurenstickstoffs (fr. AS-N) und Ammoniakstickstoffs (NH<sub>3</sub>-N) am Gesamtstickstoff (Gesamt-N) im Presssaft (PS) von der Lagerzeit (x in Tagen) unterschiedlich angewelkter und behandelter Luzernesilagen (n=21)

Anwelk- stufe	Behand- lung*	Anteil des fr. AS-N am Gesamt-N im PS [%] =	R <sup>2</sup> =	s ±	p <	Glei- chung
Frisch	0	$50,9^{***} + 4,86^{***} \cdot \ln(x)$	0,80	3,76	0,001	23
(14 % TS)	1	$39,8^{***} + 4,22^{***} \cdot \ln(x)$	0,71	4,20	0,001	24
	2	$39,6^{***} + 2,09^{**} \cdot \ln(x)$	0,42	3,85	0,01	25
Anwelk1	0	$42,2^{***} + 5,18^{***} \cdot \ln(x)$	0,52	7,78	0,001	26
(21 % TS)	2	$30,1^{***} + 5,19^{***} \cdot \ln(x)$	0,83	3,67	0,001	27
Anwelk2	0	$30,1^{***} + 3,43^{***} \cdot \ln(x)$	0,51	5,28	0,001	28
(23 % TS)	2	$23,8^{***} + 3,72^{***} \cdot \ln(x)$	0,73	3,54	0,001	29
Anwelk3	0	$35,1^{***} + 4,70^{***} \cdot \ln(x)$	0,78	3,91	0,001	30
(28 % TS)	3	$40,6^{***} + 1,94^{**} \cdot \ln(x)$	0,35	4,09	0,01	31
		Anteil des NH <sub>3</sub> -N am Gesamt-N im PS [%] =	R <sup>2</sup> =	s ±	p <	Glei- chung
Frisch	0	$6,74^{***} + 2,77^{***} \cdot \ln(x)$	0,97	0,69	0,001	32
(14 % TS)	1	$6,05^{***} + 1,43^{***} \cdot \ln(x)$	0,89	0,79	0,001	33
	2	$5,98^{***} + 0,80^{***} \cdot \ln(x)$	0,92	0,36	0,001	34
Anwelk1	0	$5,95^{***} + 2,04^{***} \cdot \ln(x)$	0,98	0,49	0,001	35
(21 % TS)	2	$4,62^{***} + 0,65^{***} \cdot \ln(x)$	0,77	0,55	0,001	36
Anwelk2	0	$4,64^{***} + 1,39^{***} \cdot \ln(x)$	0,96	0,47	0,001	37
(23 % TS)	2	$3,72^{***} + 0,49^{***} \cdot \ln(x)$	0,72	0,48	0,001	38
Anwelk3	0	$4,88^{***} + 1,43^{***} \cdot \ln(x)$	0,99	0,26	0,001	39
(28 % TS)	3	$4,68^{***} + 0,85^{***} \cdot \ln(x)$	0,79	0,67	0,001	40

\* 0: ohne, 1: Melasse, 2: Milchsäurebakterien und Melasse, 3: Milchsäurebakterien

Mit Hilfe der Regressionsgleichungen können durch Einsetzen der Lagerdauer (1, 3, 6, 12, 24, 48 und 96 Tage) die Reaktionsgeschwindigkeiten [%/d] ermittelt werden (Tabellen D.23 und D.24 im Anhang). Diese zeigen, dass die Proteolyse zu Beginn der Fermentation am stärksten ablief. Im Durchschnitt aller Varianten erhöht sich der Anteil des freien Aminosäurenstickstoffs bis zum ersten Öffnungstermin um 37 % (± 8 %). Ab dem 12. Tag nach Fermentationsbeginn erhöhen sich die Anteile kaum noch (im Mittel um 2 %) und bleiben nahezu konstant. Zu ähnlichen Kurvenverläufen kam MCKERSIE (1985), der jedoch den Proteinabbau in einem in-vitro Fermentationssystem über 72 h untersuchte, wodurch die

hauptsächliche Freisetzung von Aminosäuren bereits nach 6 h erfolgte. Diese Kinetik des Proteinabbaus wird vermutlich durch mehrere Faktoren bedingt. Zum einen nimmt nach der anfänglich starken Proteolyse zunehmend die Substratverfügbarkeit ab, während die Bildung der Endprodukte hemmend auf die weitere Proteinhydrolyse wirkt (MCKERSIE und BUCHANAN-SMITH, 1982). Zum anderen reduziert sich die proteolytische Aktivität deutlich nach den ersten 6 Lagertagen (Abbildung 5.1).

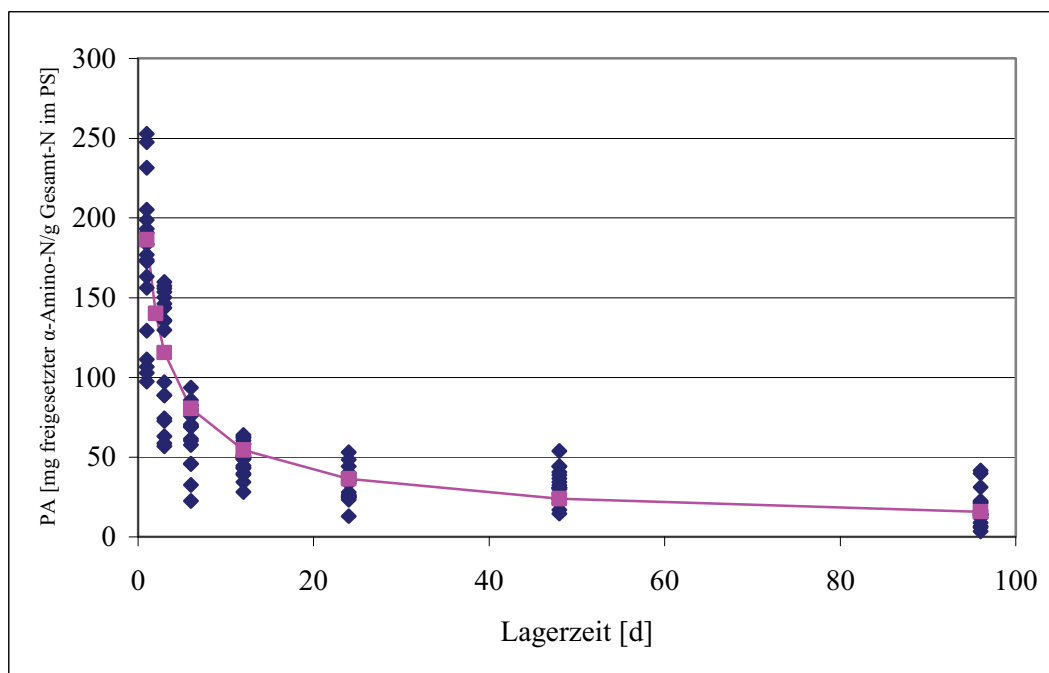


Abbildung 5.1: Veränderung der proteolytischen Aktivität (PA) im Presssaft (PS) von Luzernesilagen (Frisch, Anwelk1, Anwelk2) während der Lagerung (n=126)

Die Abnahme der proteolytischen Aktivität (y in mg freigesetzter  $\alpha$ -Amino-N/g Gesamt-N im PS) während der Lagerung (x in Tagen) folgte dabei dem durch die Gleichung vorgegebenen Verlauf:

$$y = 255 \cdot (x + 0,67)^{-0,61} \quad R^2=0,86 \quad s\pm 22,2 \quad (n=126) \quad (G 41)$$

Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen von MCKERSIE und BUCHANAN-SMITH (1982), die im Mittel eine 50 %ige Reduzierung der proteolytischen Aktivität nach 2 Tagen Silierdauer angaben. Der starke Rückgang der proteolytischen Aktivität in den ersten 3 Tagen kann entweder auf den Abbau der Enzymproteine selbst oder auch auf eine Endprodukthemmung zurückgeführt werden (MCKERSIE und BUCHANAN-SMITH, 1982; MÜNTZ, 1984). Die pH-Werte in den Silagen können zu diesem Zeitpunkt noch nicht hemmend gewirkt haben. Nur in den Anwelksilagen könnte der fermentationsbedingte

Anstieg der Osmolalität bereits zu einer Hemmung der proteolytischen Aktivität geführt haben (Tabelle D.11 im Anhang). Jedoch ist auch ein Wiederanstieg der proteolytischen Aktivität im Presssaft von Silagen denkbar, wie z.B. bei den unbehandelten Frischsilagen aus den eigenen Untersuchungen nach dem 48. Tag (siehe Tabelle 4.46, Seite 92). Dies kann sowohl auf eine Veränderung der Zusammensetzung der Silagemikroflora als auch auf eine Zunahme der Aktivität pflanzlicher Enzyme in Folge des pH-Wert-Wiederanstieges (Tabelle 4.37, Seite 77) zurückgeführt werden. Deutlich ist in der Tabelle 5.2 (Seite 109) auch der Einfluss der Silierzusätze auf die Proteolyse zu erkennen. Exemplarisch sind die Mittelwerte der Anteile des freien Aminosäurenstickstoffs am Gesamt-N im Presssaft zu den jeweiligen Öffnungsterminen der Luzernefrischsilagen in Abbildung 5.2 dargestellt. Die jeweilige Funktion (Gleichungen 23, 24 und 25) kann der Tabelle 5.2 entnommen werden.

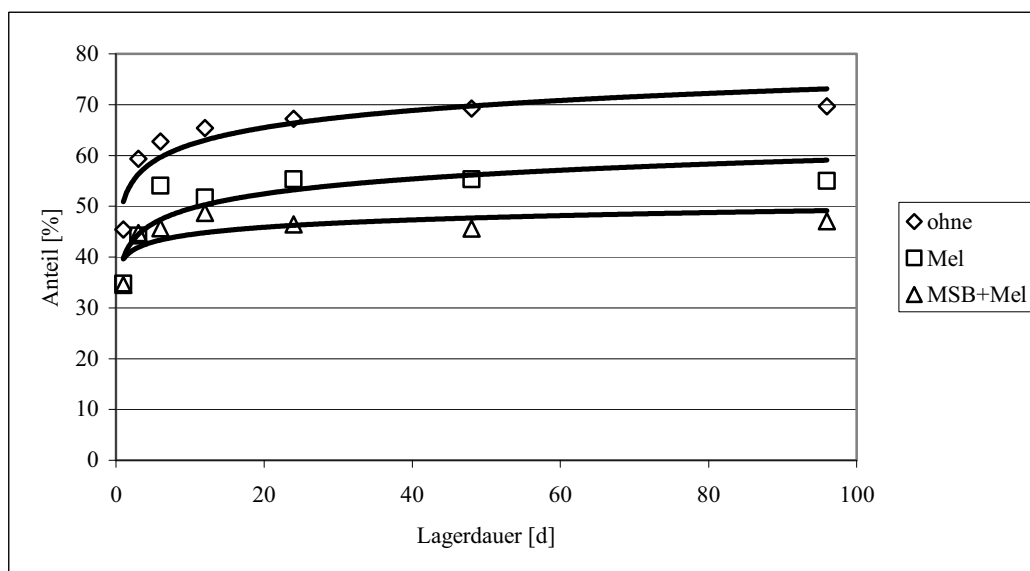


Abbildung 5.2: Anteile des freien Aminosäurenstickstoffs am Gesamtstickstoff im Presssaft von Luzernefrischsilagen in Abhängigkeit von Lagerdauer und Silierzusätzen (Melasse = Mel, Milchsäurebakterien und Melasse = MSB+Mel)

Der Kurvenverlauf der behandelten Varianten liegt stets unter dem der unbehandelten Kontrolle, d.h. der Anteil des freien Aminosäurenstickstoffs im Presssaft der behandelten Silagen war an jedem Öffnungstag niedriger als im Presssaft aus den unbehandelten Kontrollsilagen (siehe Tabelle D.21 im Anhang). Für die Anwelkstufen 1 bis 3 trifft diese Aussage ebenfalls zu.

Zur Einschätzung der Aussagefähigkeit der mit der konzipierten in-vitro Methode bestimmten proteolytischen Aktivität wurde die Beziehung zu der jeweiligen Erhöhung des Anteils des

freien Aminosäurenstickstoffs am Gesamt-N im Presssaft von Öffnungstag zu Öffnungstag hergestellt. Es ergab sich eine lineare Regression, die eindeutig nachweist, dass durch eine hohe proteolytische Aktivität ( $x$  in mg freigesetzter  $\alpha$ -Amino-N/g Gesamt-N im PS) der Anstieg des Anteils des freien Aminosäurenstickstoff am Gesamt-N im Presssaft ( $y$  in %) groß ist:

$$y = 0,41^{***} \cdot x \quad R^2=0,67 \quad s \pm 2,79 \quad p < 0,001 \quad (n=36) \quad (G 42)$$

Es wird geschlussfolgert, dass mit Hilfe der konzipierten in-vitro Methode plausible Werte für die proteolytische Aktivität analysiert werden. Daraus können Rückschlüsse auf das zu erwartende Ausmaß der Proteolyse während der Silierung gezogen werden. Die mit der konzipierten in-vitro Methode bestimmbare proteolytische Aktivität stellt somit ein brauchbares Kriterium dar. Die Kinetik der Desmolyse wird durch die logarithmischen Regressionsgleichungen besser beschrieben als die Kinetik der Proteolyse. Die mit den Mittelwerten der Anteile der jeweiligen Stickstofffraktion am Gesamtstickstoff im Presssaft (Tabelle 5.1, Seite 107) und den jeweiligen Reststreuungen der Gleichungen aus Tabelle 5.2 (Seite 109) berechneten Variationskoeffizienten der Regressionen liegen für die Ammoniakanteile überwiegend niedriger im Vergleich zu denen für die freien Aminosäurenanteile (Tabelle 5.3).

Tabelle 5.3: Variationskoeffizienten [%] der logarithmischen Regressionen (Gleichungen Nummer 23 bis 40 aus Tabelle 5.2) für die Anteile des freien Aminosäurenstickstoffs (fr. AS-N) bzw. des Ammoniakstickstoffs (NH<sub>3</sub>-N) am Gesamtstickstoff (Gesamt-N) im Presssaft (PS)

Anwelkstufe	Behandlung*	Variationskoeffizient [%] der Regressionen für die	
		Anteile des fr. AS-N am Gesamt-N im PS	Anteile des NH <sub>3</sub> -N am Gesamt-N im PS
Frisch (14 % TS)	0	6,0	5,1
	1	8,4	8,3
	2	8,6	4,6
Anwelk1 (21 % TS)	0	14,2	4,5
	2	8,6	8,9
Anwelk2 (23 % TS)	0	13,8	5,9
	2	10,8	9,8
Anwelk3 (28 % TS)	0	8,4	3,1
	3	9,0	10,0

\* 0: ohne, 1: Melasse, 2: Milchsäurebakterien und Melasse, 3: Milchsäurebakterien

Die Variationskoeffizienten machen deutlich, dass durch den Kurvenverlauf der logarithmischen Regression der degressive Anstieg der Anteile des Ammoniakstickstoffs auch bis zum Ende des Untersuchungszeitraums gut beschrieben wird. Im Gegensatz dazu bleiben die Anteile des freien Aminosäurenstickstoffs am Ende nahezu konstant und liegen deshalb unterhalb des Kurvenverlaufes (siehe Abbildung 5.2, Seite 111). Dadurch werden die größeren Variationskoeffizienten erklärbar. Im Mittel liegen diese mit 10 % signifikant höher als der mittlere Variationskoeffizient der Regressionen der Anteile des Ammoniakstickstoffs mit 7 %. Die Desmolyse kommt demzufolge während der Lagerdauer von 96 Tagen nicht zum Stillstand (siehe Tabelle D.22 im Anhang). Beispielhaft zeigt dies Abbildung 5.3 anhand der Luzernefrischsilagen, wobei die entsprechenden Regressionsgleichungen (Nummer 32 bis 34) in Tabelle 5.2 auf Seite 109 angegeben sind.

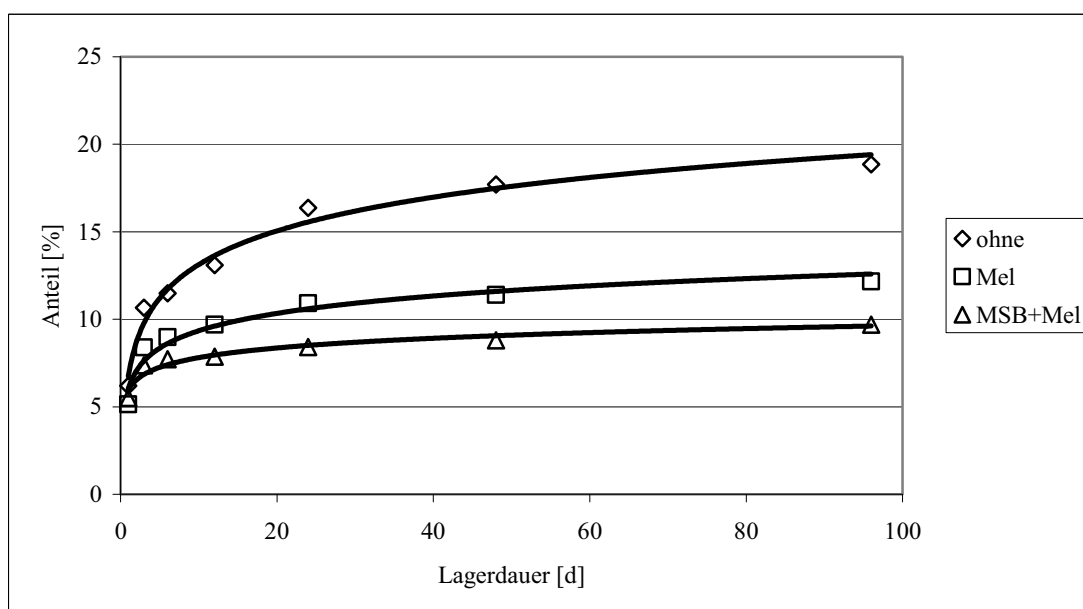


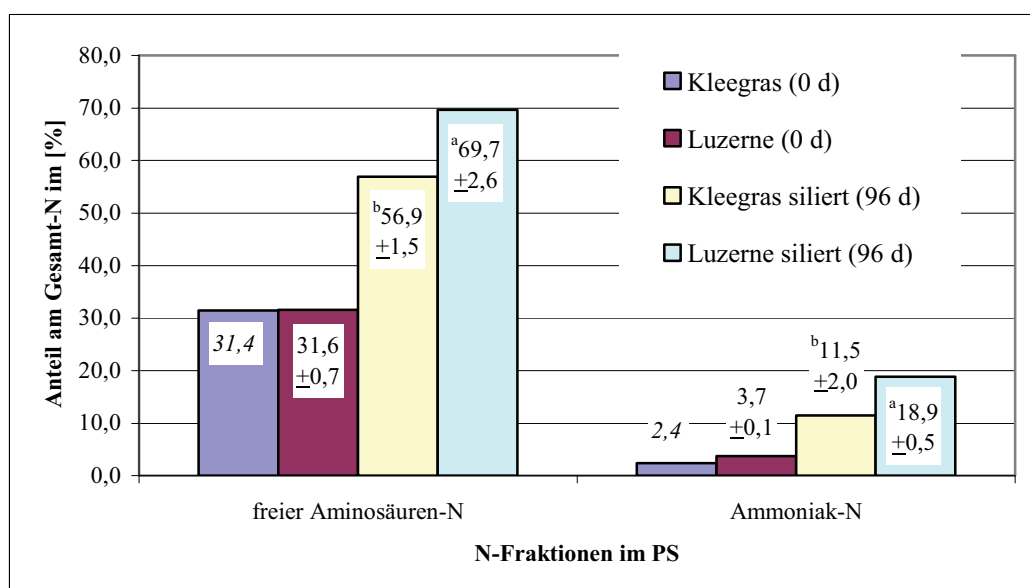
Abbildung 5.3: Anteile des Ammoniakstickstoffs am Gesamtstickstoff im Presssaft von Luzernefrischsilagen in Abhängigkeit von Lagerdauer und Silierzusätzen (Melasse = Mel, Milchsäurebakterien und Melasse = MSB+Mel)

Es wird daher angenommen, dass gerade in unbehandelten, lang gelagerten Silagen der Ammoniakgehalt sehr hoch ist. Das Ausmaß der Desmolyse wird durch den Zusatz von Silierhilfsmitteln deutlich eingeschränkt. Die Anteile des Ammoniakstickstoffs am Gesamt-N lagen im Presssaft stets niedriger als die der unbehandelten Kontrolle. Diese Aussage trifft auch für die Silagen der Anwelkstufen 1 und 2 zu (siehe Tabelle D.22 im Anhang). Am 1. Tag lagen bei den Anwelk3-Silagen die Anteile der nur mit Milchsäurebakterien behandelten Modellsilagen über den Anteilen der unbehandelten Kontrolle. Das deutet darauf hin, dass



sich auch in den behandelten Silagen die Enterobakterien zu Beginn der Silierung vermehrt haben können. Da für die Milchsäurebakterien nicht genügend Gärsubstrat zur Verfügung stand, fiel der pH-Wert für eine Hemmung dieser Gärschädlinge nicht schnell genug. Damit konnten die Enterobakterien wahrscheinlich mit den Milchsäurebakterien um die Nährstoffe konkurrieren und trugen zur verstärkten Bildung des Ammoniaks im Anfangsstadium des Silierverlaufes bei. Ab dem 3. Tag lagen die Anteile des Ammoniakstickstoffs am Gesamtstickstoff im Presssaft der mit MSB behandelten Silagen ebenfalls unter denen der unbehandelten Kontrolle.

Neben dem Anwelkgrad und den Silierzusätzen kommen weitere Faktoren in Betracht, die die proteolytische Aktivität beeinflussen können. Mit der konzipierten in-vitro Methode wurden sowohl zwischen Pflanzenart und -sorten als auch zwischen Vegetationsstadien differierende proteolytische Aktivitäten quantifiziert. Aus Kapazitätsgründen konnte nur der Unterschied zwischen Klee gras und Luzerne mit Modellsilagen validiert werden. Das unsilierte Klee gras wies im Vergleich zur unsilierten Luzerne eine deutlich geringere proteolytische Aktivität auf (siehe Tabelle 4.35, Seite 74). Dadurch werden Ergebnisse von MCKERSIE (1985) und PICHARD *et al.* (2006) bestätigt. Zu abweichenden Aussagen kamen jedoch PAPADOPOULOS und MCKERSIE (1983b) sowie JONES *et al.* (1995a), die in ihren Untersuchungen für Rotklee und Luzerne keine unterschiedlichen proteolytischen Aktivitäten feststellten. Hinsichtlich des Proteinabbaus während der Silierung fanden die Autoren jedoch einen stärkeren Proteinabbau in den Luzernesilagen im Vergleich zu den Silagen aus Rotklee. Sie führten dies auf das Vorhandensein von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen (PPO) zurück (JONES *et al.*, 1995b), die vor allem im Rotklee vorkommen. Auch in den eigenen Untersuchungen lief der Proteinabbau in den Klee grassilagen schwächer ab als in den Luzernesilagen (Abbildung 5.4).



<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede innerhalb einer N-Fraktion für  $p < 0,05$

Abbildung 5.4: Anteil des freien Aminosäurenstickstoffs und des Ammoniakstickstoffs am Gesamtstickstoff (Gesamt-N) im Presssaft (PS) von Modellsilagen aus Klee gras (16,7 % TS) und Luzerne (13,6 % TS) vor (0 d) und nach der Silierung (96 d)

Im Vergleich zu Luzerne war das Ausmaß sowohl von Proteolyse als auch von Desmolyse während der Silierung im Klee gras geringer, was zu niedrigeren Anteilen des freien Aminosäurenstickstoffs resp. Des Ammoniakstickstoffs im Presssaft aus der Klee grassilage führte. Auch der Anteil des Reinprotein-N am Gesamt-N war in den Klee grassilagen nach 96 Tagen Silierdauer mit 34 % signifikant höher (siehe Seite 91) als in den Luzernesilagen, in denen nur 27 % als Reinprotein-N vorlagen (siehe Tabelle 4.43, Seite 88). Einen weiteren Hinweis auf einen geringer zu erwartenden Proteinabbau bei der Silierung des Klee grasses im Vergleich zu Luzerne zeigt die Gegenüberstellung der Gesamtstickstoffgehalte in den unsilierten Pflanzenmaterialien und in den daraus hergestellten Presssäften (Tabelle 5.4).

Tabelle 5.4: Gesamtstickstoffgehalte im Pflanzenmaterial und im Presssaft von Luzerne und Klee gras

Pflanzenmaterial (unsiliert)	Trockensubstanz [%]	Gesamtstickstoffgehalt im	
		Pflanzenmaterial [% der TS]	Presssaft [% der TSPS]
Luzerne (n=12)	21,2 ±5,3	<sup>b</sup> 3,0 ±0,1	<sup>a</sup> 3,2 ±0,1
Klee gras (n=4)	27,2 ±9,3	<sup>a</sup> 3,3 ±0,1	<sup>b</sup> 2,0 ±0,2

<sup>a,b</sup> Unterschiedliche Kleinbuchstaben bedeuten signifikante Unterschiede in einer Spalte für  $p < 0,05$

Bei signifikant höheren Gesamt-N-Gehalten des Kleegrases im Vergleich zu Luzerne lag der Gesamt-N-Gehalt des Kleegraspresssaftes signifikant niedriger als der des Luzernepresssaftes. Es ist davon auszugehen, dass das Klee gras einen höheren Anteil membrangebundener Proteine aufweist, die während der Silierung nicht abgebaut werden (ROOKE und HATFIELD, 2003). Demzufolge steht im Luzernepresssaft dem Proteinabbau mehr Substrat zur Verfügung als im Klee graspresssaft. Da neben der proteolytischen Aktivität noch weitere Faktoren wie Substratverfügbarkeit und -angreifbarkeit das Ausmaß des Proteinabbaus während der Silierung beeinflussen können (BOWLEY und MCKERSIE, 1987), ist von einer Summe von Faktoren auszugehen, die den geringeren Proteinabbau bei der Silierung von Klee gras bedingt. Auch im Vergleich zu Gräsern kennzeichneten MESSMAN *et al.* (1994) das Luzerneprotein anfälliger gegenüber dem Abbau.

Als Faktor, der die Proteinangreifbarkeit und damit das Maß des Proteinabbaus während der Silierung beeinflusst, gilt das Vorhandensein von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen wie Tannine (ALBRECHT und MUCK, 1991). Diese kommen in verschiedenen Pflanzenarten in unterschiedlichen Gehalten vor. Auch die vorliegenden Ergebnisse konnten die Wirkung der Tannine hinsichtlich der Reduzierung des Proteinabbaus während der Silierung nachweisen. Ein Zusatz von Hornklee als tanninhaltiges Pflanzenmaterial reduzierte im Vergleich zur reinen Luzernesilage sowohl die Proteolyse als auch die Desmolyse in den Mischsilagen (siehe Kapitel 4.2.3.4, Seite 93). Damit wurden sowohl die eigenen Aussagen der Untersuchungen mit dem modifizierten RFT bestätigt (siehe Kapitel 4.2.2.1.6, Tabelle 4.25, Seite 65) als auch die gleichen Ergebnisse wie von SALAWU *et al.* (1999) und ALBRECHT und MUCK (1991) erhalten. Allerdings war der Einfluss der Tannine nur ohne den Zusatz von Silierhilfsmitteln von Bedeutung. Beim Zusatz von Milchsäurebakterien und Melasse wiesen die Vergleichssilagen ohne Tannine (reine Luzernesilagen) und die Mischsilagen aus Luzerne und Hornklee im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollsilagen signifikant niedrigere Anteile von freiem Aminosäurenstickstoff und Ammoniakstickstoff am Gesamtstickstoff im Presssaft auf. Sie unterschieden sich jedoch nicht voneinander. Dies wird darauf zurückgeführt, dass durch den Silierzusatz die Fermentation schnell einsetzte, ohne dass der proteinschützende Vorteil der Tannine zum Tragen kam.

Da alle Aussagen, die anhand der Stickstofffraktionen im Presssaft getroffen wurden, in Übereinstimmung mit den ausgewerteten Ergebnissen der Literatur sind, kann der Presssaft als einfach herstellbares Untersuchungsmedium in der Praxis eingesetzt werden, um den Siliererfolg vor allem hinsichtlich der Proteinqualität zu beurteilen. Darüber hinaus zeigt der methodische Ansatz (modifizierter RFT und in-vitro Methode zur Bestimmung der

proteolytischen Aktivität) das, was aus der Literatur bekannt ist. Demnach sind beide Verfahren geeignet, bisher nicht untersuchte Fragestellungen zu bearbeiten.

#### 5.5 Weiterer Forschungsbedarf durch die Ergebnisse der Bestimmung der proteolytischen Aktivität verschiedener Rotklee presssäfte

Auch innerhalb einer Pflanzenart können große Schwankungen der proteolytischen Aktivität in Abhängigkeit von der Sorte auftreten. Die analysierten Enzymaktivitäten verschiedener Rotkleearten variierten stark. Dabei ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen diploiden und tetraploiden Rotkleearten (siehe Kapitel 4.2.2.2.3, Seite 70). Auch PICHARD *et al.* (2006) wiesen nach, dass zwar die größten Unterschiede zwischen den Pflanzenarten auftraten, die proteolytische Aktivität jedoch auch stark sortenabhängig war. Gut untersucht wurden verschiedene Luzernesorten, deren proteolytische Aktivitäten sich signifikant unterschieden (PAPADOPOULOS und MCKERSIE, 1983a; BOWLEY und MCKERSIE, 1987). PAPADOPOULOS und MCKERSIE (1983a) stellten in den Silagen aus diesen sich hinsichtlich der proteolytischen Aktivität unterscheidenden Luzernesorten jedoch keine signifikanten Unterschiede im Gehalt an löslichem NPN fest. TREMBLAY *et al.* (2001), die jedoch keine Bestimmung der proteolytischen Aktivität vornahmen, stellten große Variationen beim Proteinabbau während der Silierung von 27 Luzernesorten fest. Sowohl TREMBLAY *et al.* (2001) als auch PICHARD *et al.* (2006) sehen in der Züchtung von Sorten mit niedriger proteolytischer Aktivität eine gute Chance, Silagen mit geringem Proteinabbau herzustellen. Inwieweit sich die bereits erwähnten Unterschiede der proteolytischen Aktivität bei den Rotkleearten auf den tatsächlichen Proteinabbau während der Silierung auswirken, wurde nicht untersucht und stellt somit dringenden Forschungsbedarf dar.

Eine weitere Möglichkeit zur Beeinflussung der proteolytischen Aktivität besteht durch die Auswahl des Vegetationsstadiums des einzusilierenden Pflanzenmaterials. Wie die Untersuchungen an diploiden und tetraploiden Rotkleearten gezeigt haben, nahm die proteolytische Aktivität während der phänologischen Entwicklung von der Knospe bis zur Blüte zu (siehe Tabelle 4.28, Seite 68). Dies kann durch die Verschiebung des Verhältnisses von Proteinsynthese hin zum Proteinabbau bei der Blattalterung begründet werden. Dabei nimmt nicht nur die Kapazität zur Proteinsynthese ab, sondern es kann auch zur Zunahme des Leistungsvermögens zum Proteinabbau kommen. Dieses kommt entweder durch steigende Enzymaktivitäten oder durch Neusynthese von Enzymen zustande (MÜNTZ, 1984).

Steigende proteolytische Aktivitäten während des Vegetationsverlaufes stellten auch NIERI *et al.* (1998), MORRIS *et al.* (1996) und WATERS *et al.* (1980) fest. Sie brachten diese in Verbindung mit der Bereitstellung von Aminosäuren aus den vegetativen Pflanzenteilen zur Synthese von Speicherproteinen für die Samenfüllung. In Folge dessen sanken die Gehalte des löslichen Proteins (PEOPLES *et al.*, 1980; NIERI *et al.*, 1998) und des  $\alpha$ -Amino-N (WATERS *et al.*, 1980) in den Blättern. Analoge Aussagen sind auch aus den vorliegenden Untersuchungen an den diploiden Rotkleesorten zu treffen, da der Gesamt-N- und der  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt im Presssaft im beprobten Zeitraum kontinuierlich abnahmen (Tabelle D.9 im Anhang). Die Gehalte der N-Fractionen im Presssaft der tetraploiden Rotkleesorten stiegen zunächst an, bevor sie ab Beginn der Blüte wieder zurückgingen (Abbildung 5.5).

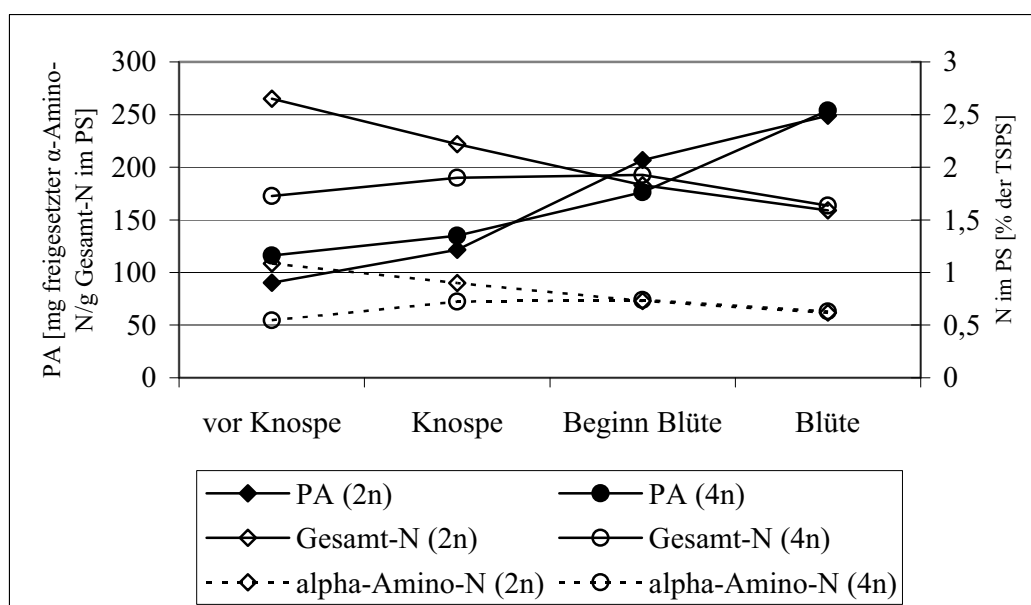


Abbildung 5.5: Proteolytische Aktivität (PA) und ausgewählte Stickstofffraktionen im Presssaft (PS) von diploiden (2n) und tetraploiden (4n) Rotkleesorten im Vegetationsverlauf

Dieses differenzierte Verhalten der Stickstofffraktionen im Presssaft der tetraploiden Rotkleesorten im Vergleich zu dem der diploiden ist vermutlich auf genetisch bedingte Unterschiede bei der Inhaltsstoffproduktion zurückzuführen (BELLMANN, 1966). Dadurch wird unter anderem auch der Stickstoffmetabolismus beeinflusst. Der Gesamt-N-Gehalt der Gesamtpflanze [% der TS] sank sowohl bei den diploiden als auch bei den tetraploiden Rotkleesorten im Verlauf des beprobten Zeitraumes (Tabelle D.9 im Anhang). Dieses Ergebnis stimmt mit den Werten der DLG-Futterwerttabellen (DLG, 1997) überein. Das

vermehrte Stengelwachstum in diesem Stadium führt zu einer Zunahme des Rohfaseranteils an der Trockensubstanz.

Aus Sicht der Silierung ist demzufolge ein früher Schnittzeitpunkt anzuraten. Pflanzenmaterialien verfügen vermutlich im frühen Vegetationsstadium nur über eine niedrige Proteinabbaukapazität. Damit könnte der Anteil, den pflanzliche Enzyme am Proteinabbau während der Silierung ausüben, deutlich reduziert werden. Weiterhin wäre damit die „Angriffsfläche“ für Mikroorganismen kleiner, wodurch die Desmolyse bei der Silierung ebenfalls reduziert werden könnte. Silierversuche mit Pflanzenmaterial unterschiedlicher phänologischer Entwicklungsstadien sollten diese Hypothese überprüfen.

## 6 Schlussfolgerungen

Mit Grünfütterleguminosen und deren Silagen wurden methodische Untersuchungen zur Quantifizierung der proteolytischen Aktivität sowie zur Beeinflussbarkeit des zu erwartenden Proteinabbaus bei der Silierung durchgeführt. Diese führten zu einer in-vitro Methode für die Bestimmung der proteolytischen Aktivität sowie zu einer Modifikation des Rostocker Fermentationstests in Form der Bestimmung der  $\alpha$ -Amino-N-Gehalte in den Extrakten nach Inkubationsende. Aus den methodischen Untersuchungen, den Ergebnissen der konzipierten in-vitro Methode zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität sowie aus den Ergebnissen des modifizierten Rostocker Fermentationstests lassen sich folgende Aussagen ableiten.

1. Der Presssaft ist als repräsentative und einfach herstellbare Probe der wässrigen Phase von Grünfütterleguminosen und deren Silagen geeignet, um die proteolytische Aktivität und die Veränderungen der Stickstofffraktionen während des Silierprozesses zu charakterisieren. Je höher der Stickstoffgehalt im Presssaft in Relation zum Stickstoffgehalt des Pflanzenmaterials ist, desto größer ist die Anfälligkeit des Pflanzenmaterials, dem Proteinabbau während der Silierung zu unterliegen. Der Proteinabbau wird als Summe der Prozesse Proteolyse und Desmolyse verstanden, die bei der Silierung zum Anstieg der Stickstofffraktionen freier Aminosäurenstickstoff resp. Ammoniakstickstoff im Presssaft führen. Durch den Bezug auf den jeweiligen Gesamtstickstoffgehalt im Presssaft werden die Ergebnisse von unterschiedlichen Silagen vergleichbar. Der Anteil des freien Aminosäurenstickstoffs am Gesamtstickstoff im Presssaft kann den bisher zur Beurteilung des Proteinabbaus genutzten Parameter, den Anteil des Reinproteinstickstoffs am Gesamtstickstoff der Silage, ersetzen.
2. Die proteolytische Aktivität ist die Wirkung der Enzyme der wässrigen Phase (Presssaft) auf ein pflanzliches Testproteinpräparat bei Berücksichtigung der Eigenproteolyse des Presssaftes und der Eigenproteolyse des Testproteinpräparates. Sie wird durch die freigesetzte Menge an  $\alpha$ -Amino-N quantifiziert und berechnet sich wie folgt:  

$$PA = PL_{ges} - PL_{eigenPS} - PL_{eigenTPL} \text{ [mg freigesetzter } \alpha\text{-Amino-N aus der TPL/ml Presssaft]}$$
 Die so ermittelten Werte werden auf den im Presssaft enthaltenen Gesamtstickstoff bezogen, so dass als Einheit mg freigesetzter  $\alpha$ -Amino-N aus der TPL/g Gesamt-N im PS angegeben wird.
3. Durch die Quantifizierung der proteolytischen Aktivität ist das Potential eines Pflanzenmaterials, Proteine während der Silierung hydrolytisch zu spalten, einschätzbar. Eine hohe proteolytische Aktivität führt zu einer verstärkten Zunahme des Anteils von

freiem Aminosäurenstickstoff am Gesamtstickstoff im Presssaft, was auf eine hohe Proteolyse zurückgeführt wird.

4. Der modifizierte Rostocker Fermentationstest ist geeignet, um die Beeinflussbarkeit des zu erwartenden Proteinabbaus während der Silierung zu untersuchen. Dies zeigen die zur Validierung angelegten Modellsilagen, die die Ergebnisse des modifizierten Rostocker Fermentationstests generell bestätigen. Die untersuchten Faktoren (pH-Wert und Osmolalität) beeinflussten die proteolytische Aktivität und den Proteinabbau so, wie es nach den Untersuchungen mit dem modifizierten Rostocker Fermentationstest zu erwarten war. Je früher und je tiefer der pH-Wert abfällt, desto geringer sind die proteolytische Aktivität und der Proteinabbau. Die in engem Zusammenhang stehenden Einflussgrößen Osmolalität und Anwelkgrad beeinflussen das Ausmaß des Proteinabbaus und die proteolytische Aktivität in gleicher Weise. Je höher die Osmolalität bzw. der Anwelkgrad sind, desto niedriger sind die proteolytische Aktivität und der Proteinabbau.
5. Analog zu den Untersuchungen mit dem modifizierten Rostocker Fermentationstest ist auch aus den Silierversuchen abzuleiten, dass der pH-Wert die proteolytische Aktivität und den Proteinabbau stärker beeinflusst als die Osmolalität. Stärker angewelkte Modellsilagen hatten einen deutlich höheren Anteil an freiem Aminosäurenstickstoff und Ammoniakstickstoff am Gesamtstickstoff im Presssaft als weniger stark angewelkte Modellsilagen, welche einen schnelleren pH-Wert-Abfall aufwiesen. Dieser Sachverhalt wird ebenfalls durch die mehrfachregressive Auswertung der Wirkungen der beiden Faktoren pH-Wert und Osmolalität sowohl auf die proteolytische Aktivität in den Presssäften der Modellsilagen als auch auf den  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt in den Extrakten des modifizierten Rostocker Fermentationstests bestätigt.
6. Der Zusatz von MSB und Melasse reduziert den Proteinabbau während der Silierung, wobei die Wirkung durch den im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle schnelleren pH-Wert-Abfall hervorgerufen wird. Diese bereits im modifizierten Rostocker Fermentationstest getroffene Aussage wird durch die Ergebnisse der Modellsilagen erweitert. Demzufolge werden die für die Proteolyse verantwortlichen Pflanzenenzyme durch den rapide herbeigeführten pH-Wert-Abfall wirksam gehemmt, so dass hinsichtlich der Proteolyse keine spezifische Wirkung der Zusätze besteht. Jedoch zeichnet sich ein direkter Einfluss des MSB-Zusatzes auf die Desmolyse ab, der vermutlich zur Unterdrückung desmolytisch wirksamer Mikroorganismen führt.
7. Durch den Zusatz von Thiomersal zu den Aufgüssen im modifizierten Rostocker Fermentationstest kann die Wirkung pflanzlicher und mikrobieller proteinabbauender



Enzyme voraussichtlich differenziert werden. Die infolge der Fermentation absinkenden pH-Werte der unbehandelten Variante müssen jedoch abgepuffert werden, um die Wirkung der mikrobiellen Enzyme ohne mögliche pH-Wert-Hemmung quantifizieren zu können. Im Gegensatz dazu ist die Quantifizierung der Wirkung der pflanzlichen Enzyme allein durch den Thiomersalzzusatz möglich. Zu diesem Komplex besteht weiterer Forschungsbedarf.

8. Der Presssaft aus unsiliertem Klee gras hat einen geringeren Stickstoffgehalt sowie eine niedrigere proteolytische Aktivität als der Presssaft aus der Luzerne, obwohl das Klee gras selbst einen höheren Stickstoffgehalt aufweist. Daraus folgt die Einschätzung, dass das Klee gras mit einer geringeren Abbauanfälligkeit des Proteins verbunden mit einer niedrigeren proteolytischen Aktivität dem Proteinabbau während der Silierung weniger ausgesetzt ist als die Luzerne. Dies bestätigt sich anhand der Zusammensetzung der Stickstofffraktionen der Modellsilagen. Der Einfluss pflanzenspezifischer Wirkungen auf die proteolytische Aktivität und den Proteinabbau resultiert demnach aus der spezifischen Zusammensetzung des Rohproteins und/oder dem Vorhandensein spezifischer Inhaltsstoffe, die den Proteinabbau beeinflussen.
9. Die mittels des modifizierten Rostocker Fermentationstests getroffene Aussage, dass Tanninzusätze als sekundärer Pflanzeninhaltsstoff den Proteinabbau hemmen, konnte durch die Herstellung von Mischsilagen aus Luzerne und tanninhaltigem Hornklee im Vergleich zu reiner Luzernesilage eindeutig bestätigt werden. Auch die mit großer Wahrscheinlichkeit im Rotklee vorhandenen PPO (JONES *et al.*, 1995b) reduzieren in den Mischsilagen aus Luzerne und Rotklee die Proteolyse und Desmolyse deutlich. Durch den Zusatz von Milchsäurebakterien und Melasse wird die Wirkung dieser sekundären Pflanzeninhaltsstoffe durch die schnell einsetzende Fermentation jedoch relativiert. Das Ausmaß des Proteinabbaus war in allen behandelten Silagen gleich und signifikant niedriger als das der unbehandelten Kontrollsilagen.
10. Die proteolytische Aktivität 10 verschiedener Rotkleesorten nimmt während des Vegetationsverlaufes zu. Die als Screening durchgeführten Untersuchungen lassen erwarten, dass sich die proteolytische Aktivität anderer Pflanzenarten ähnlich verhält (WATERS *et al.*, 1980; MORRIS *et al.*, 1996; NIERI *et al.*, 1998). Damit kann die Bestimmung der proteolytischen Aktivität vor der Silierung ein zusätzliches Kriterium zur Festlegung des optimalen Schnitzeitpunktes von Siliergütern darstellen.
11. Tetraploide Rotkleesorten weisen im Vergleich zu diploiden Sorten eine statistisch gesicherte niedrigere proteolytische Aktivität auf. Dieser im Screening ermittelte

bemerkenswerte Befund, der sich jedoch nicht in allen untersuchten Vegetationsstadien zeigte, konnte aus Kapazitätsgründen nicht mit Modellsilagen validiert werden. Aufgrund der Bedeutung, die diesem Ergebnis nach entsprechender Absicherung zukommen würde, besteht dringender Forschungsbedarf.

## 7 Zusammenfassung

Der Proteinabbau während der Silierung muss grundsätzlich negativ bewertet werden, vor allem dann, wenn der Prozess über die Bildung freier Aminosäuren hinausgeht. Allgemeine Kenntnisse über die Beeinflussbarkeit des Proteinabbaus liegen vor. Diese müssen jedoch erweitert werden, da die Proteinversorgung landwirtschaftlicher Nutztiere mit einheimischen Grünfütterleguminosen unter dem Aspekt der Nachhaltigkeit eine immer größer werdende Bedeutung erhält. Dazu ist es notwendig, im Vorfeld das zu silierende Pflanzenmaterial hinsichtlich seiner Proteinabbauanfälligkeit zu charakterisieren. Das zu erwartende Ausmaß des Proteinabbaus während der Silierung hängt sowohl von der Abbaubarkeit des Proteins als auch von der proteolytischen Aktivität des Pflanzenmaterials inklusive des mikrobiellen Besatzes ab. Um Parameter für die Abbauanfälligkeit des Proteins zu definieren und die Veränderungen dieser Parameter unter bestimmten Einflussgrößen während der Fermentation zu charakterisieren sowie eine für die Silierpraxis geeignete in-vitro Methode zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität zu konzipieren, wurden methodische Untersuchungen zur Quantifizierung des Proteinabbaus durchgeführt. Diese wurden mit Modellsilagen validiert. Im modifizierten Rostocker Fermentationstest wurden wässrige Aufgüsse von Luzerne unter zuvor festgelegten Bedingungen inkubiert, um die Wirkung verschiedener Einflussfaktoren auf den Proteinabbau während der Fermentation unter in-vitro Bedingungen anhand des  $\alpha$ -Amino-N-Gehaltes in den Extrakten nach Inkubationsende zu bewerten. Die konzipierte in-vitro Methode zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität wurde bei verschiedenen Grünfütterleguminosen (Luzerne, Klee gras, 10 verschiedene Rotkleearten) mit differenzierten Fragestellungen durchgeführt, um mögliche, die Aktivität beeinflussende Faktoren zu charakterisieren. Die Validierung der Methode zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität sowie der Ergebnisse des modifizierten Rostocker Fermentationstests erfolgte durch Untersuchungen mit Modellsilagen in unterschiedlichem Anwelkgrad und mit verschiedenen Silierzusätzen (Melasse, Milchsäurebakterien und deren Kombination).

Die methodischen Untersuchungen zeigten, dass sich der Presssaft aus Grünfütterleguminosen und deren Silagen als für das Ausgangsmaterial repräsentatives Untersuchungsmedium eignet. Es konnten Parameter im Presssaft analysiert werden, die einerseits zur Einschätzung des zu erwartenden Proteinabbaus und andererseits zur Beurteilung des Proteinabbaus nach der Silierung genutzt wurden:

1. Die Bestimmung der proteolytischen Aktivität im Presssaft mit der konzipierten in-vitro Methode lieferte reproduzierbare Werte. Als geeignetes Bewertungskriterium wurde der  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt verschiedener Inkubationsmedien (Presssaft mit und ohne Testproteinpräparatzusatz, Testproteinpräparatlösung) definiert, der photometrisch modifiziert nach ROSEN (1957) bestimmt wurde. Die proteolytische Aktivität wurde unter Berücksichtigung der Eigenproteolyse des Presssaftes und des pflanzlichen Testproteinpräparates rechnerisch durch Differenzbildung ermittelt.
2. Als Parameter für die Anfälligkeit des Pflanzenmaterials, dem Proteinabbau während der Silierung zu unterliegen, wurde der Gesamtstickstoffgehalt des Presssaftes in Relation zum Gesamtstickstoffgehalt des Pflanzenmaterials definiert. Um die Zusammensetzung der Stickstofffraktionen im Presssaft vor dem Silierbeginn zu charakterisieren, erfolgte die Bestimmung des freien Aminosäurenstickstoffs und des Ammoniakstickstoffs. Die Untersuchungen zeigten, dass die Prozesse Proteolyse und Desmolyse zu einem Anstieg der Stickstofffraktionen freier Aminosäurenstickstoff resp. Ammoniakstickstoff im Presssaft führten. Um das Ausmaß des Proteinabbaus von verschiedenen Silagen vergleichen zu können, wurden die Stickstofffraktionen auf den jeweiligen Gesamtstickstoffgehalt im Presssaft bezogen. Da eine hohe proteolytische Aktivität mit einem großen Anstieg des freien Aminosäurenstickstoffanteils korrelierte, waren die Ergebnisse der konzipierten in-vitro Methode zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität aussagefähig. Es wurde weiterhin nachgewiesen, dass durch die Bestimmung des freien Aminosäurenstickstoffs auf die Reinproteinstickstoffbestimmung in den Silagen als den traditionellen Parameter zur Proteinqualitätsbeurteilung verzichtet werden konnte.

Die Untersuchungen des Einflusses von externen und internen Faktoren auf den Proteinabbau führten sowohl mit dem modifizierten Rostocker Fermentationstest als auch mit den Modellsilagen zu identischen Ergebnissen.

1. Ein schneller pH-Wert-Abfall reduzierte den Proteinabbau wirkungsvoll. Im modifizierten Rostocker Fermentationstest wurden durch Zugabe von Milchsäure verschiedene pH-Werte eingestellt, um die Wirkung des pH-Wertes gezielt zu untersuchen. Darüber hinaus führten geeignete Silierzusätze (MSB und Melasse) zu Luzerne sowohl im modifizierten Rostocker Fermentationstest als auch bei den Modellsilagen zu einer Verminderung des Proteinabbaus. Dabei war dieser Effekt unabhängig vom Anwelkgrad der Modellsilagen. Die reduzierte Proteolyse resultierte aus dem im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle schnelleren pH-Wert-Abfall. In Folge dessen wurde auch die Entwicklung von Enterobakterien gehemmt, die vor allem zu Beginn der Silierung bei einer ungenügend

schnellen Ansäuerung desmolytisch wirken können. Weiterhin erfolgte durch den Zusatz von Milchsäurebakterien eine Verdrängung von desmolytisch wirksamen Bakterien (u.a. Clostridien), so dass die Desmolyse ebenfalls in geringerem Ausmaß ablief.

2. Durch die Zugabe unterschiedlich konzentrierter KCl-Lösungen im modifizierten Rostocker Fermentationstest und durch das Anwelken der Luzerne vor Herstellung der Modellsilagen wurde der Einfluss verschiedener Osmolalitäten auf den Proteinabbau untersucht. Es zeigte sich, dass eine erhöhte Osmolalität sowohl den Proteinabbau als auch die proteolytische Aktivität verringerte. Dennoch konnte der Anwelckgrad der Modellsilagen nicht beliebig gesteigert werden. Bei zu hohem Anwelckgrad nahm der Proteinabbau im Vergleich zu weniger stark angewelkten Modellsilagen wieder zu. Dies wurde auf den verlangsamten pH-Wert-Abfall zurückgeführt. Dennoch war der Proteinabbau in den Anwelksilagen geringer als in den Frischsilagen. Das belegte auch der Vergleich von Frisch- und Anwelksilagen aus Klee gras.
3. Mit dem Zusatz von Tanninen im modifizierten Rostocker Fermentationstest wurde der Einfluss eines sekundären Pflanzeninhaltsstoffs untersucht. Dadurch wurde der Proteinabbau minimiert. Die Untersuchungen mit Mischmodellsilagen aus Luzerne mit tanninhaltigem Hornklee bestätigten diese Aussage. Auch PPO als sekundärer Pflanzeninhaltsstoff im Rotklee reduzierten in den Mischsilagen aus Luzerne mit Rotklee den Proteinabbau im Vergleich zu reinen Luzernesilagen. Allerdings relativierte sich deren Wirkung durch den Einsatz geeigneter Siliermittel.

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Luzerne im Vergleich zu Klee gras eine höhere Abbauanfälligkeit des Proteins sowie eine höhere proteolytische Aktivität aufwies. Dies führte zu einem stärkeren Proteinabbau während der Silierung der Frischsilagen aus Luzerne im Vergleich zu denen aus Klee gras. Weiterer Forschungsbedarf besteht hinsichtlich der ermittelten Unterschiede der proteolytischen Aktivität von tetraploiden und diploiden Rotkleesorten.

Aus den Untersuchungen wurde abgeleitet, dass im Vorfeld der Silierung der modifizierte Rostocker Fermentationstest, die Bestimmung der proteolytischen Aktivität und der Stickstoffgehalt des Presssaftes in Relation zum Stickstoffgehalt des Siliergutes Aussagen über die bei der Silierung individuell für das jeweilige Grünfüttermittel zu treffenden Maßnahmen liefern, die neben der optimalen Gestaltung des Silierverlaufes besonders den Schutz des Proteins erwarten lassen.

## 8 Literaturverzeichnis

- AERTS, R. J., T. N. BARRY und W. C. MCNABB (1999a): Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture Ecosystems & Environment* 75 (1-2), 1-12
- AERTS, R. J., W. C. MCNABB, A. MOLAN, A. BRAND, T. N. BARRY und J. S. PETERS (1999b): Condensed tannins from *Lotus corniculatus* and *Lotus pedunculatus* exert different effects on the in vitro rumen degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (1), 79-85
- ALBRECHT, K. A. und R. E. MUCK (1991): Proteolysis in Ensiled Forage Legumes That Vary in Tannin Concentration. *Crop Science* 31 (2), 464-469
- BARRY, T. N., J. E. COOK und R. J. WILKINS (1978a): Influence of Formic-Acid and Formaldehyde Additives and Type of Harvesting Machine on Utilization of Nitrogen in Lucerne Silages. 1. Voluntary Intake and Nitrogen-Retention of Young Sheep Consuming Silages with and without Intra-Peritoneal Supplements of DL-Methionine. *Journal of Agricultural Science* 91, 701-715
- BARRY, T. N., D. C. MUNDELL, R. J. WILKINS und D. E. BEEVER (1978b): The Influence of Formic-Acid and Formaldehyde Additives and Type of Harvesting Machine on Utilization of Nitrogen in Lucerne Silages. 2. Changes in Amino-Acid-Composition during Ensiling and Their Influence on Nutritive-Value. *Journal of Agricultural Science* 91, 717-725
- BECK, T. (1966): Die Mikrobiologie der Gärfutterbereitung - Eine zusammenfassende Darstellung des derzeitigen Wissenstandes. *Das Wirtschaftseigene Futter* 12, 227-263
- BELLMANN, K. (1966): Der Futterwert von diploidem und tetraploidem Rotklee und einige Möglichkeiten zu seiner Verbesserung durch die Züchtung. *Theoretical and Applied Genetics* 36 (3), 126-135
- BENEYTOUT, J. L., A. NAJID und M. TIXIER (1988): Changes in Lipoxygenase Activity during Seedling Development of *Lupinus-Albus*. *Plant Science* 58 (1), 35-41
- BLANK, R., K.-H. SÜDEKUM, I. IMMIG und J. KLEINMANS (1998): Synchroner Abbau von Kohlenhydraten und Rohprotein in den Vormägen - eine neue Variable für die Rationsgestaltung. *Übersichten Tierernährung* 26, 157-188
- BLETHEN, D. B., J. E. WOHLT, D. K. JASAITIS und J. L. EVANS (1990): Feed Protein Fractions: Relationship to Nitrogen Solubility and Degradability. *Journal of Dairy Science* 73 (6), 1544-1551
- BOWLEY, S. R. und B. D. MCKERSIE (1987): Genetic Variance of Proteolytic Activity in Alfalfa Herbage. *Canadian Journal of Plant Science* 67 (1), 159-165
- BRADY, C. J. (1960): Reditribution of nitrogen in grass and leguminous fodder plants during wilting and ensilage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 11, 276-284
- BRADY, C. J. (1961): The Leaf Protease of *Trifolium Repens*. *Biochemical Journal* 78 (3), 631-640
- BREVES, G. und S. WOLFFRAM (2006): Transport systems in the epithelia of small and large intestines. In: SEJRSEN, K., T. HVELPLUND und M. O. NIELSEN [Hrsg.]: *Ruminant physiology*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, 139-154
- BROCK, F. M., C. W. FORSBERG und J. G. BUCHANANSMITH (1982): Proteolytic Activity of Rumen Microorganisms and Effects of Proteinase-Inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology* 44 (3), 561-569

- BROUQUISSE, R., C. MASCLAUX, U. FELLER und P. RAYMOND (2001): Protein Hydrolysis and Nitrogen Remobilisation in Plant Life and Senescence. In: LEA, P. J. und J.-F. MOROT-GAUDRY [Hrsg.]: Plant Nitrogen. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 275-293
- CALLIS, J. (1995): Regulation of Protein-Degradation. *Plant Cell* 7 (7), 845-857
- CARPINTERO, C. M., A. R. HENDERSON und P. MCDONALD (1979): Effect of Some Pre-Treatments on Proteolysis during the Ensiling of Herbage. *Grass and Forage Science* 34 (4), 311-315
- CASTILLO, A. R., E. KEBREAB, D. E. BEEVER, J. H. BARBI, J. D. SUTTON, H. C. KIRBY und J. FRANCE (2001): The effect of protein supplementation on nitrogen utilization in lactating dairy cows fed grass silage diets. *Journal of Animal Science* 79 (1), 247-253
- CASTRO ALEGRIA, A. (1999): Untersuchungen zum Futterwert von verschiedenen Sorghumsorten für den Einsatz bei Broilern. Dissertation, Universität Rostock
- CAVALLARIN, L., S. ANTONIAZZI, G. BORREANI, P. G. PEIRETTI, E. TABACCO und M. E. VALENTE (2000): Effect of different levels of wilting on fermentation pattern of lucerne ensiled at two stages of maturity. *Grassland Science in Europe* 5, 50-52
- CAVALLARIN, L., S. ANTONIAZZI, G. BORREANI und E. TABACCO (2005): Effects of wilting and mechanical conditioning on proteolysis in sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) wilted herbage and silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85 (5), 831-838
- CAVALLARIN, L., S. ANTONIAZZI, G. BORREANI, E. TABACCO und M. E. VALENTE (2002a): Effect of chestnut tannin on protein degradation in lucerne silages. *Grassland Science in Europe* 7, 68-69
- CHAMBERLAIN, D. G., P. C. THOMAS und M. K. WAIT (1982): The Rate of Addition of Formic-Acid to Grass at Ensilage and the Subsequent Digestion of the Silage in the Rumen and Intestines of Sheep. *Grass and Forage Science* 37 (2), 159-164
- CHARMLEY, E. und D. M. VEIRA (1990): Inhibition of Proteolysis at Harvest Using Heat in Alfalfa Silages - Effects on Silage Composition and Digestion by Sheep. *Journal of Animal Science* 68 (3), 758-766
- CHERNIKOVA, T., J. M. ROBINSON, E. H. LEE und C. L. MULCHI (2000): Ozone tolerance and antioxidant enzyme activity in soybean cultivars. *Photosynthesis Research* 64 (1), 15-26
- CLIMENT, P. V., M. L. M. SERRALHEIRO und M. J. F. REBELO (2001): Development of a new amperometric biosensor based on polyphenoloxidase and polyethersulphone membrane. *Pure and Applied Chemistry* 73 (12), 1993-1999
- COUPE, S. A., B. K. SINCLAIR, L. M. WATSON, J. A. HEYES und J. R. EASON (2003): Identification of dehydration-responsive cysteine proteases during post-harvest senescence of broccoli florets. *Journal of Experimental Botany* 54 (384), 1045-1056
- CRUZ SOTO, R., S. A. MUHAMMED, C. J. NEWBOLD, C. S. STEWART und R. J. WALLACE (1994): Influence of peptides, amino acids and urea on microbial activity in the rumen of sheep receiving grass hay and on the growth of rumen bacteria in vitro. *Animal Feed Science and Technology* 49 (1-2), 151-161
- DAVIES, D. R., R. J. MERRY, A. P. WILLIAMS, E. L. BAKEWELL, D. K. LEEMANS und J. K. S. TWEED (1998): Proteolysis during ensilage of forages varying in soluble sugar content. *Journal of Dairy Science* 81 (2), 444-453
- DEWHURST, R. J., D. R. DAVIES und R. J. MERRY (2000): Microbial protein supply from the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 85 (1-2), 1-21

- DHINDSA, R. S., P. PLUMBDHINDSA und T. A. THORPE (1981): Leaf Senescence - Correlated with Increased Levels of Membrane-Permeability and Lipid-Peroxidation, and Decreased Levels of Superoxide-Dismutase and Catalase. *Journal of Experimental Botany* 32 (126), 93-101
- DLG (1997): DLG-Futterwerttabellen für Wiederkäuer. Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft e. V., Frankfurt am Main
- DOSE, K. (1996): Biochemie, Eine Einführung. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- DRESSLER, D. und H. POTTER (1992): Katalysatoren des Lebens, Struktur und Wirkung von Enzymen. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg
- DRIEHUIS, F. und P. G. VAN WIKSELAAR (1996): The occurrence of alcoholic fermentation in high dry matter grass silages. *Proceedings of the XIth International Silage Conference, Aberystwyth*, 254-255
- ECKERT, R. (1993): Tierphysiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- FAIRBAIRN, R., I. ALLI und B. E. BAKER (1988): Proteolysis Associated with the Ensiling of Chopped Alfalfa. *Journal of Dairy Science* 71 (1), 152-158
- FINLEY, J. W., C. PALLAVICINI und G. O. KOHLER (1980): Partial Isolation and Characterization of Medicago-Sativa Leaf Proteases. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 31 (2), 156-161
- FOTHERGILL, M., M. E. REES, F. R. MINCHIN und A. L. WINTERS (2004): PPO in Red Clover. *Proceedings of the WG1 and WG2 Meeting, Ystad, Sweden*
- FREMERY, D. D., G. O. KOHLER und E. M. BICKOFF (1972): Pro-Xan Process - Stability of Proteins and Carotenoid Pigments in Freshly Expressed Alfalfa Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 20 (6), 1155-1158
- GARCIA, A. D., W. G. OLSON, D. E. OTTERBY, J. G. LINN und W. P. HANSEN (1989): Effects of Temperature, Moisture, and Aeration on Fermentation of Alfalfa Silage. *Journal of Dairy Science* 72 (1), 93-103
- GENELL, S., B. E. GUSTAFSSON und K. OHLSSON (1976): Quantitation of Active Pancreatic Endopeptidases in Intestinal Contents of Germfree and Conventional Rats. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 11 (8), 757-762
- GIVENS, D. I. (2000): Forage evaluation in ruminant nutrition. Cabi Publ, Wallingford
- GIVENS, D. I. und H. RULQUIN (2004): Utilisation by ruminants of nitrogen compounds in silage-based diets. *Animal Feed Science and Technology* 114 (1-4), 1-18
- GOERING, H. K. und P. J. VAN SOEST (1970): Forage fiber analysis. *Agricultural Handbook No. 379. ARS, USDA, Washington*, 1-12
- GOUET, P. und N. FATIANOFF (1964): Les bactéries de l'ensilage. 1. Tentative de différenciation entre les actions enzymatiques des cellules végétales et des cellules bactériennes dans la glycolyse et la protéolyse d'un ensilage de luzerne. *Annales de l'Institute Pasteur* 107, 711-723
- GREENHILL, W. L. (1964a): Plant juices in relation to silage fermentation. I. The role of the juice. *Journal of the British Grassland Society* 19, 30-37
- GREENHILL, W. L. (1964b): Plant juices in relation to silage fermentation. III. Effect of water activity of juice. *Journal of the British Grassland Society* 19, 336-339
- GREENWALD, I. (1915): The estimation of non-protein nitrogen in blood. *Journal of Biological Chemistry* 21 (1), 61-68
- GRUM, D. E., W. L. SHOCKEY und W. P. WEISS (1991): Electrophoretic Examination of Alfalfa Silage Proteins. *Journal of Dairy Science* 74 (1), 146-154
- HARDING, V. J. und R. M. MACLEAN (1916): The Ninhydrin reaction with amines and amides. *Journal of Biological Chemistry* 25 (2), 337-350



- HARTMANN, A., K. FRIEDEL, R. F. DÍAZ CASAS, E. M. OTT und M. GABEL (2005): Ensiling - a method for reducing tannin contents in red sorghum breeds. Proceedings of the 3rd International Conference on Agricultural Development and Sustainability, Santa Clara, Kuba
- HATFIELD, R. D. und R. E. MUCK (1999): Characterizing Proteolytic Inhibition in Red Clover Silage. Proceedings of the XIIth International Silage Conference, Uppsala, Sweden, Swedish University of Agricultural Sciences, 147-148
- HEIER, W. (1983): Das Fraktionieren von Gras. Grundlagen der Landtechnik 33 (2), 45-56
- HELDT, H. W. (1999): Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin
- HENDERSON, A. R. und P. MCDONALD (1971): Effect of Formic Acid on Fermentation of Grass of Low Dry Matter Content. Journal of the Science of Food and Agriculture 22 (4), 157-163
- HERNÁNDEZ-ROMERO, D., F. SOLANO und A. SANCHEZ-AMAT (2005): Polyphenol oxidase activity expression in *Ralstonia solanacearum*. Applied and Environmental Microbiology 71 (11), 6808-6815
- HERON, S. J. E., R. A. EDWARDS und P. MCDONALD (1986): Changes in the Nitrogenous Components of Gamma-Irradiated and Inoculated Ensiled Ryegrass. Journal of the Science of Food and Agriculture 37 (10), 979-985
- HERON, S. J. E., R. A. EDWARDS und P. PHILLIPS (1989): Effect of Ph on the Activity of Ryegrass *Lolium-Multiflorum* Proteases. Journal of the Science of Food and Agriculture 46 (3), 267-277
- HERTWIG, F. und BUNDESARBEITSKREIS FUTTERKONSERVIERUNG (2006): Praxishandbuch Futterkonservierung: Silagebereitung, Siliermittel, Dosiergeräte, Silofolien. DLG-Verlag, Frankfurt am Main
- HOEDTKE, S. (2002): Entwicklung einer in-vitro Methode zur Beurteilung der proteolytischen Aktivität in Pflanzen. Diplomarbeit, Universität Rostock
- HOEDTKE, S. (2008): Die Quantifizierung der Osmolalität in Futterpflanzen und ihre Veränderung in verschiedenen Stadien der Silierung. Dissertation, Universität Rostock
- HRISTOV, A. N. und J.-P. JOUANY (2005): Factors Affecting the Efficiency of Nitrogen Utilization in the Rumen. In: PFEFFER, E. und A. N. HRISTOV [Hrsg.]: Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle. CABI Publishing, Oxfordshire, 117-166
- HRISTOV, A. N. und S. G. SANDEV (1998): Proteolysis and rumen degradability of protein in alfalfa preserved as silage, wilted silage or hay. Animal Feed Science and Technology 72 (1-2), 175-181
- HUFFAKER, R. C. (1990): Proteolytic activity during senescence of plants. New Phytologist 116 (2), 199-231
- JAKUBE, H.-D. und H. JESCHKEIT (1982): Aminosäuren, Peptide, Proteine: Eine Einführung. Akademie-Verlag, Berlin
- JEROCH, H., W. DROCHNER und O. SIMON (1999): Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- JONES, B. A., R. D. HATFIELD und R. E. MUCK (1995a): Characterization of Proteolysis in Alfalfa and Red-Clover. Crop Science 35 (2), 537-541
- JONES, B. A., R. D. HATFIELD und R. E. MUCK (1995b): Screening Legume Forages for Soluble Phenols, Polyphenol Oxidase and Extract Browning. Journal of the Science of Food and Agriculture 67 (1), 109-112
- JONES, B. A., R. E. MUCK und R. D. HATFIELD (1995c): Red-Clover Extracts Inhibit Legume Proteolysis. Journal of the Science of Food and Agriculture 67 (3), 329-333

- JONES, B. A., L. D. SATTER und R. E. MUCK (1992): Influence of Bacterial Inoculant and Substrate Addition to Lucerne Ensiled at Different Dry-Matter Contents. *Grass and Forage Science* 47 (1), 19-27
- JONES, M. L., G. S. CHAFFIN, J. R. EASON und D. G. CLARK (2005): Ethylene-sensitivity regulates proteolytic activity and cysteine protease gene expression in *petunia corollas*. *Journal of Experimental Botany* 56 (420), 2733-2744
- KARLSON, P., D. DOENECKE und J. KOOLMAN (1994): Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Thieme-Verlag, Stuttgart
- KEMBLE, A. R. (1956): Studies on the Nitrogen Metabolism of the Ensilage Process. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 7, 125-130
- KEMBLE, A. R. und H. T. MACPHERSON (1954): Liberation of Amino Acids in Perennial Rye Grass during Wilting. *Biochemical Journal* 58 (1), 46-49
- KIM, K. H., J. J. CHOUNG und D. G. CHAMBERLAIN (1999): Effects of varying the degree of synchrony of energy and nitrogen release in the rumen on the synthesis of microbial protein in lactating dairy cows consuming a diet of grass silage and a cereal-based concentrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (11), 1441-1447
- KINGSTON-SMITH, A. H., R. J. MERRY, D. K. LEEMANS, H. THOMAS und M. K. THEODOROU (2005): Evidence in support of a role for plant-mediated proteolysis in the rumens of grazing animals. *British Journal of Nutrition* 93 (1), 73-79
- KINGSTON-SMITH, A. H. und M. K. THEODOROU (2000): Post-ingestion metabolism of fresh forage. *New Phytologist* 148 (1), 37-55
- KIRCHGESSNER, M. (2004): Tierernährung: Leitfaden für Studium, Beratung und Praxis. DLG-Verlag, Frankfurt am Main
- KLEBER, H.-P. und D. SCHLEE (1991): Allgemeine und funktionelle Biochemie. Gustav-Fischer-Verlag, Jena
- KOSCHUH, W., S. KROMUS und C. KROTSCHECK (2003): Grüne Bioraffinerie - Gewinnung von Proteinen aus Grassäften. Endbericht, Kornberg Institut, Feldbach
- KUNITZ, M. (1947): Crystalline Soybean Trypsin Inhibitor .2. General Properties. *Journal of General Physiology* 30 (4), 291-310
- LEE, M. R. F., A. L. WINTERS, N. D. SCOLLAN, R. J. DEWHURST, M. K. THEODOROU und F. R. MINCHIN (2004): Plant-mediated lipolysis and proteolysis in red clover with different polyphenol oxidase activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84 (13), 1639-1645
- LENGERKEN, J. V. und K. ZIMMERMANN (1991): Handbuch Futtermittelprüfung: Grundlagen, Trends, ausgewählte Methoden. Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin
- LIBBERT, E. (1993): Lehrbuch der Pflanzenphysiologie. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart
- LINDGREN, S. (1991): Hygienic problems in conserved forages. Forage conservation towards 2000. *Landbauforschung Völkenrode Sonderheft* 123, 177-190
- LINDGREN, S., K. PETTERSSON, A. JONSSON, P. LINGVALL und A. KASPERSSON (1985): Silage inoculation: selected strains, temperature, wilting and practical application. *Swedish Journal of Agricultural Research* 15, 9-18
- LÖFFLER, G. (2005): Basiswissen Biochemie. Springer Verlag, Heidelberg
- LÖSCHE, M., H. SALAMA, M. GIERUS, A. HERRMANN, P. VOSS und F. TAUBE (2008): Variation in plant-mediated proteolysis among 10 diploid perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) genotypes. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology*, Göttingen, 17, 154

- LOW, A. G. (1982): The Activity of Pepsin, Chymotrypsin and Trypsin during 24-H Periods in the Small-Intestine of Growing-Pigs. *British Journal of Nutrition* 48 (1), 147-159
- LOW, A. G. und T. ZEBROWSKA (1989): Digestion in pigs. In: BOCK, H.-D., B. O. EGGUM, A. G. LOW, O. SIMON und T. ZEBROWSKA [Hrsg.]: *Protein Metabolism in Farm Animals*. Oxford Science Publications, Deutscher Landwirtschaftsverlag, Oxford, Berlin, 53-121
- LUCHINI, N. D., G. A. BRODERICK, R. E. MUCK, N. F. MAKONI und R. L. VETTER (1997): Effect of storage system and dry matter content on the composition of alfalfa silage. *Journal of Dairy Science* 80 (8), 1827-1832
- LYTTLETON, J. W. (1973): Proteins and Nucleic Acids. In: BUTLER, G. W. und R. W. BAILEY [Hrsg.]: *Chemistry and Biochemistry of Herbage*. Academic Press, London, New York, 1, 63-103
- MACFADYEN, D. A. (1950): On the Mechanism of the Reaction of Ninhydrin with  $\alpha$ -Amino Acids. I. Absorption Spectra of Ninhydrin and certain Derivatives. *Journal of Biological Chemistry* 186 (1), 1-12
- MACPHERSON, H. T. (1952): Changes in Nitrogen Distribution in Crop Conservation .1. The Rate and Extent of Protein Breakdown in Ensilage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 3 (8), 362-365
- MACPHERSON, H. T. und J. S. SLATER (1959): Gamma-Amino-Normal-Butyric, Aspartic, Glutamic and Pyrrolidonecarboxylic Acid - Their Determination and Occurrence in Grass during Conservation. *Biochemical Journal* 71, 654-660
- MAJDOUB, A., G. T. LANE und T. E. AITCHISON (1978): Milk-Production Response to Nitrogen Solubility in Dairy Rations. *Journal of Dairy Science* 61 (1), 59-65
- MAKKAR, H. P. S. und A. V. GOODCHILD (1996): Quantification of tannins: a laboratory manual. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Aleppo, Syria iv, 25pp
- MAKONI, N. F., G. A. BRODERICK und R. E. MUCK (1997): Effect of modified atmospheres on proteolysis and fermentation of ensiled alfalfa. *Journal of Dairy Science* 80 (5), 912-920
- MARSHALL, S. A., C. P. CAMPBELL und J. G. BUCHANANSMITH (1993): Proteolysis and Rumen Degradability of Alfalfa Silages Preserved with a Microbial Inoculant, Spent Sulfite Liquor, Formic-Acid or Formaldehyde. *Canadian Journal of Animal Science* 73 (3), 559-570
- MARTIN, J. S. und M. M. MARTIN (1983): Tannin Assays in Ecological-Studies - Precipitation of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase Oxygenase by Tannic-Acid, Quebracho, and Oak Foliage Extracts. *Journal of Chemical Ecology* 9 (2), 285-294
- MASON, V. C., Z. KRAGELUND und B. O. EGGUM (1982): Influence of Fiber and Nebacitin on Microbial Activity and Amino-Acid Digestibility in the Pig and Rat. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 48 (5), 241-252
- MCALLISTER, T. A., H. D. BAE, G. A. JONES und K. J. CHENG (1994): Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *Journal of Animal Science* 72 (11), 3004-3018
- MCDONALD, P., A. R. HENDERSON und S. J. E. HERON (1991): *The Biochemistry of Silage*. Cambrian Printers Ltd, Aberystwyth
- MCKERSIE, B. D. (1981): Proteinases and Peptidases of Alfalfa Herbage. *Canadian Journal of Plant Science* 61 (1), 53-59
- MCKERSIE, B. D. (1985): Effect of pH on Proteolysis in Ensiled Legume Forage. *Agronomy Journal* 77 (1), 81-86

- MCKERSIE, B. D. und J. BUCHANAN-SMITH (1982): Changes in the Level of Proteolytic Enzymes in Ensiled Alfalfa Forage. *Canadian Journal of Plant Science* 62, 111-116
- MCLEOD, M. N. (1974): Plant tannins - their role in forage quality. *Nutrition Abstracts and Reviews* 44, 803-814
- MERRY, R. J., A. L. WINTERS, P. I. THOMAS, M. MULLER und T. MULLER (1995): Degradation of Fructans by Epiphytic and Inoculated Lactic-Acid Bacteria and by Plant Enzymes during Ensilage of Normal and Sterile Hybrid Ryegrass. *Journal of Applied Bacteriology* 79 (6), 583-591
- MESSMAN, M. A., W. P. WEISS und M. E. KOCH (1994): Changes in Total and Individual Proteins During Drying, Ensiling, and Ruminal Fermentation of Forages. *Journal of Dairy Science* 77 (2), 492-500
- MIN, B. R., T. N. BARRY, G. T. ATTWOOD und W. C. MCNABB (2003): The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology* 106 (1-4), 3-19
- MORRIS, K., H. THOMAS und L. J. ROGERS (1996): Endopeptidases during the development and senescence of *Lolium temulentum* leaves. *Phytochemistry* 41 (2), 377-384
- MUCK, R. E. (1987): Dry-Matter Level Effects on Alfalfa Silage Quality .1. Nitrogen Transformations. *Transactions of the Asae* 30 (1), 7-14
- MUCK, R. E. und J. T. DICKERSON (1988): Storage-Temperature Effects on Proteolysis in Alfalfa Silage. *Transactions of the Asae* 31 (4), 1005-1009
- MÜLLER, A. (1996): Balancing amino acids in pig diets. *Schweinezucht und Schweinemast* 4, 14-15
- MÜNTZ, K. (1984): Stickstoffmetabolismus der Pflanzen. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
- MÜNTZ, K., F. R. BLATTNER und A. D. SHUTOV (2002): Legumains - a family of asparagine-specific cysteine endopeptidases involved in propolypeptide processing and protein breakdown in plants. *Journal of Plant Physiology* 159 (12), 1281-1293
- NIERI, B., S. CANINO, R. VERSACE und A. ALPI (1998): Purification and characterization of an endoprotease from alfalfa senescent leaves. *Phytochemistry* 49 (3), 643-649
- NRC (2001): Nutrient Requirements of Dairy Cattle. National Academy Press, Washington, D.C.
- OHSHIMA, M. und P. MCDONALD (1978): Review of Changes in Nitrogenous Compounds of Hbage during Ensilage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 29 (6), 497-505
- OHSHIMA, M., P. MCDONALD und T. ACAMOVIC (1979): Changes during Ensilage in the Nitrogenous Components of Fresh and Additive Treated Ryegrass and Lucerne. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 30 (2), 97-106
- OSBORNE, T. B. (1924): The Vegetable Proteins. Longmans, Green & Co., London, New York
- OTT, E. M., Y. ACOSTA ARAGÓN und M. GABEL (2005): Ensiling of tannin-containing sorghum grain. *Proceedings of the 14th International Silage Conference, a satellite workshop of the 20th International Grassland Congress, Belfast, Northern Ireland*, 178
- OWENS, V. N., K. A. ALBRECHT und R. E. MUCK (1999a): Protein degradation and ensiling characteristics of red clover and alfalfa wilted under varying levels of shade. *Canadian Journal of Plant Science* 79 (2), 209-222
- OWENS, V. N., K. A. ALBRECHT und R. E. MUCK (2002): Protein degradation and fermentation characteristics of unwilted red clover and alfalfa silage harvested at various times during the day. *Grass and Forage Science* 57 (4), 329-341

- OWENS, V. N., K. A. ALBRECHT, R. E. MUCK und S. H. DUKE (1999b): Protein degradation and fermentation characteristics of red clover and alfalfa silage harvested with varying levels of total nonstructural carbohydrates. *Crop Science* 39 (6), 1873-1880
- PAHLOW, G. (1978): Activity of proteolytic enzymes in silage. In: FAL [Hrsg.]: Jahresbericht der Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig-Völkenrode, G30
- PAPADOPOULOS, Y. A. und B. D. MCKERSIE (1983a): Variation in Proteolysis among Alfalfa Cultivars during Ensiling. *Canadian Journal of Plant Science* 63 (1), 346-347
- PAPADOPOULOS, Y. A. und B. D. MCKERSIE (1983b): A Comparison of Protein-Degradation during Wilting and Ensiling of 6 Forage Species. *Canadian Journal of Plant Science* 63 (4), 903-912
- PEOPLES, M. B., V. C. BEILHARZ, S. P. WATERS, R. J. SIMPSON und M. J. DALLING (1980): Nitrogen Redistribution during Grain-Growth in Wheat (*Triticum-Aestivum* L.) 2. Chloroplast Senescence and the Degradation of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase. *Planta* 149 (3), 241-251
- PICHARD, G. R., B. R. TESSER, C. VIVES, C. SOLARI, A. HOTT und R. E. LARRAIN (2006): Proteolysis and Characterization of Peptidases in Forage Plants. *Agronomy Journal* 98 (6), 1392-1399
- PIEPER, B., J. KLEEMAN und S. POPPE (1989): Verfahren zur Bestimmung der Vergärbarkeit von Futtermitteln. Patentschrift, DD 281 255 A5
- PLANTNER, J. J. (1991): A Microassay for Proteolytic Activity. *Analytical Biochemistry* 195 (1), 129-131
- POINSSOT, B., E. VANDELLE, M. BENTEJAC, M. ADRIAN, C. LEVIS, Y. BRYGOO, J. GARIN, F. SICILIA, P. COUTOS-THEVENOT und A. PUGIN (2003): The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16 (6), 553-564
- POPPE, S. und H. MEIER (1993): Futtermittel als Nährstoffträger. In: WIESEMÜLLER, W. und J. LEIBETSEDER [Hrsg.]: Ernährung monogastrischer Nutztiere. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 26-57
- RATCLIFFE, B. und A. G. LOW (1984): Studies on the Effect of the Gut Microflora on Dietary Nitrogen Digestibility in Pigs. *Animal Production* 38, 535-535
- REED, J. D. (1995): Nutritional Toxicology of Tannins and Related Polyphenols in Forage Legumes. *Journal of Animal Science* 73 (5), 1516-1528
- REUTER, B. (1982): Untersuchungen zum Eiweiß- und Aminosäurenabbau bei der Grünfuttersilierung. Dissertation, Forschungszentrum für Tierproduktion Dummerstorf, Rostock
- ROHN, S., H. M. RAWEL, U. WOLLENBERGER und J. KROLL (2003): Enzyme activity of alpha-chymotrypsin after derivatization with phenolic compounds. *Nahrung-Food* 47 (5), 325-329
- ROOKE, J. A. und R. D. HATFIELD (2003): Biochemistry of Ensiling. In: BUXTON, D. R., R. E. MUCK und J. H. HARRISON [Hrsg.]: Silage Science and Technology. American Society of Agronomy, Inc., Madison, Wisconsin, USA, Agronomy 42, 95-139
- ROSE, S. P., D. M. ANDERSON und M. B. WHITE (1994): The Growth of Pigs from 6 to 10 Kg When Fed Fish Silages That Were Preserved Either by Formic-Acid or by Fermentation. *Animal Feed Science and Technology* 49 (1-2), 163-169

- ROSEN, H. (1957): A Modified Ninhydrin Colorimetric Analysis for Amino Acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 67, 10-15
- RUSSELL, J. B., J. D. OCONNOR, D. G. FOX, P. J. VANSOEST und C. J. SNIFFEN (1992): A Net Carbohydrate and Protein System for Evaluating Cattle Diets .1. Ruminant Fermentation. *Journal of Animal Science* 70 (11), 3551-3561
- SALAWU, M. B., T. ACAMOVIC, C. S. STEWART, T. HVELPLUND und M. R. WEISBJERG (1999): The use of tannins as silage additives: effects on silage composition and mobile bag disappearance of dry matter and protein. *Animal Feed Science and Technology* 82 (3-4), 243-259
- SARKAR, S. K., R. E. HOWARTH und B. P. GOPLIN (1976): Condensed Tannins in Herbaceous Legumes. *Crop Science* 16 (4), 543-546
- SCALET, M., A. ALPI und P. PICCIARELLI (1984): Proteolytic Activities in Alfalfa (Medicago-Sativa L) Leaves. *Journal of Plant Physiology* 116 (2), 133-145
- SCHMIDT, T. (2003): Untersuchungen zum Einfluss methodischer und futterspezifischer Faktoren bei der Charakterisierung der Dynamik ruminaler Abbauprozesse von Protein und Kohlenhydratfraktionen. Dissertation, Universität Rostock
- SCHUSTER, M., M. MORWARID und H. SATTES (1991): Verbrennungsmethode nach Dumas zur Bestimmung des Proteingehaltes in Futtermitteln. *VDLUFA Schriftenreihe* 33, 526-531
- SCHWAB, G. C., P. HUHTANEN, C. W. HUNT und T. HVELPLUND (2005): Nitrogen Requirements of Cattle. In: PFEFFER, E. und A. HRISTOV [Hrsg.]: Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle. CABI Publishing, Oxfordshire, 13-70
- SEALE, D. R., A. R. HENDERSON, K. O. PETTERSSON und J. F. LOWE (1986): The effect of addition of sugar and inoculation with two commercial inoculants on the fermentation of lucerne silage in laboratory silos. *Grass and Forage Science* 41 (1), 61-70
- SEYFARTH, W., O. KNABE und G. WEISE (1989a): Protein-Degradation during Silaging of Green Fodder. *Archives of Animal Nutrition* 39 (8-9), 685-691
- SEYFARTH, W., O. KNABE und G. WEISE (1989b): Changes in the N-Fraction of Green Fodder during Wilting and Silaging. 1. Changes in the N-Fraction of the Plant-Material during Wilting in Swathe. *Archives of Animal Nutrition* 39 (8-9), 751-761
- SHANNAK, S., K.-H. SÜDEKUM und A. SUSENBETH (1999): Estimating ruminal crude protein degradation by in sacco and chemical fractionation methods. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology, Göttingen, DLG Verlag*, 8, 71
- SIDDONS, R. C., J. V. NOLAN, D. E. BEEVER und J. C. MACRAE (1985): Nitrogen digestion and metabolism in sheep consuming diets containing contrasting forms and levels of N. *British Journal of Nutrition* 54 (1), 175-187
- SINGH, N. (1962): Proteolytic Activity of Leaf Extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 13 (6), 325-332
- SLOTTNER, D. und J. BERTILSSON (2006): Effect of ensiling technology on protein degradation during ensilage. *Animal Feed Science and Technology* 127 (1-2), 101-111
- SNIFFEN, C. J., J. D. OCONNOR, P. J. VANSOEST, D. G. FOX und J. B. RUSSELL (1992): A Net Carbohydrate and Protein System for Evaluating Cattle Diets. 2. Carbohydrate and Protein Availability. *Journal of Animal Science* 70 (11), 3562-3577
- SPEIJERS, M. H. M., M. D. FRASER, R. FYCHAN, V. J. THEOBALD und A. WINTERS (2002): Evaluation of different silage additives for ensiling lucerne and red clover. *Proceedings of the XIIIth International Silage Conference, Auchincruive*, 112-113

- STRASBURGER, E., F. NOLL, H. SCHENCK und A. F. W. SCHIMPER (1991): Lehrbuch für Botanik für Hochschulen. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York
- SULLIVAN, M. L. und R. D. HATFIELD (2006): Polyphenol oxidase and o-diphenols inhibit postharvest proteolysis in red clover and alfalfa. *Crop Science* 46 (2), 662-670
- SULLIVAN, M. L., R. D. HATFIELD, S. L. THOMA und D. A. SAMAC (2004): Cloning and characterization of red clover polyphenol oxidase cDNAs and expression of active protein in *Escherichia coli* and transgenic alfalfa(1[w]). *Plant Physiology* 136 (2), 3234-3244
- SULLIVAN, M. L., S. L. THOMA, D. A. SAMAC und R. D. HATFIELD (2003): Cloning Red Clover and Alfalfa Polyphenol Oxidase Gene and Expression of Active Enzymes in Transgenic Alfalfa. In: HOPKINS, A., Z. Y. WANG, R. MIAN, M. SLEDGE und R. BARKER [Hrsg.]: *Molecular Breeding of Forage and Turf*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 189-195
- SUTTON, A. L. und R. L. VETTER (1971): Nitrogen Studies with Lambs Fed Alfalfa (Medicago-Sativa) as Hay, Low-Moisture and High-Moisture Silages. *Journal of Animal Science* 32 (6), 1256-1261
- SWAIN, T. (1977): Secondary Compounds as Protective Agents. *Annual Review of Plant Physiology* 28 (1), 479-501
- SWEENEY, T. E. und C. A. BEUCHAT (1993): Limitations of Methods of Osmometry - Measuring the Osmolality of Biological-Fluids. *American Journal of Physiology* 264 (3), R469-R480
- TABATABAI, M. A. und J. M. BREMNER (1969): Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry* 1 (4), 301-307
- TAMMINGA, S. und K.-H. SÜDEKUM (2000): Optimize feeding value of forage protein. *Proceedings of Grassland Farming - Balancing environmental and economic demands*, Aalborg, Denmark, EGF, 5, 143-156
- TAMMINGA, S. und M. W. A. VERSTEGEN (1992): Implications of nutrition of animals on environmental pollution. In: GARNSWORTHY, P. C., W. HARESIGN und D. J. A. COLE [Hrsg.]: *Recent Advances in Animal Nutrition*. Nottingham University Press, Nottingham, 26, 113-130
- THEODOROU, M. K., R. J. MERRY und H. THOMAS (1996): Is proteolysis in the rumen of grazing animals mediated by plant enzymes? *British Journal of Nutrition* 75 (3), 507-508
- TREMBLAY, G. F., G. BELANGER, K. B. MCRAE und R. MICHAUD (2001): Proteolysis in alfalfa silages made from different cultivars. *Canadian Journal of Plant Science* 81 (4), 685-692
- VAGNONI, D. B., G. A. BRODERICK und R. E. MUCK (1997): Preservation of protein in wilted lucerne using formic, sulphuric or trichloroacetic acid. *Grass and Forage Science* 52 (1), 5-11
- VAN SOEST, P. J. (1994): *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Cornell University Press, Ithaca, London
- VANLEEUEWEN, P., A. J. M. JANSMAN, J. WIEBENGA, J. F. J. G. KONINKX und J. M. V. M. MOUWEN (1995): Dietary-Effects of Faba-Bean (*Vicia-Faba* L) Tannins on the Morphology and Function of the Small-Intestinal Mucosa of Weaned Pigs. *British Journal of Nutrition* 73 (1), 31-39
- VOIGT, J. und H. STEGER (1967): Zur quantitativen Bestimmung von Ammoniak, Harnstoff und Ketokörpern in biologischem Material mit Hilfe eines modifizierten Mikrodiffusionsgefäßes. *Archives of Animal Nutrition* 17, 289-293

- VOSS, N. (1967): Untersuchungen über Proteinabbau in Gras- und Luzernesilagen. Das Wirtschaftseigene Futter 13 (2), 130-145
- WALKER, N. D., C. J. NEWBOLD und R. J. WALLACE (2005): Nitrogen Metabolism in the Rumen. In: PFEFFER, E. und A. HRISTOV [Hrsg.]: Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle. CABI Publishing, Oxfordshire, 71-116
- WATERS, S. P., M. B. PEOPLES, R. J. SIMPSON und M. J. DALLING (1980): Nitrogen Redistribution during Grain-Growth in Wheat (*Triticum-Aestivum* L.). 1. Peptide-Hydrolase Activity and Protein Breakdown in the Flag Leaf, Glumes and Stem. *Planta* 148 (5), 422-428
- WEISSBACH, F. (1967): Die Bestimmung der Pufferkapazität der Futterpflanzen und ihre Bedeutung für die Beurteilung der Vergärbarkeit. Tagungsbericht 92, 211-220
- WEISSBACH, F. und H. HONIG (1993): DLG-Schlüssel zur Beurteilung der Gärqualität von Grünfuttersilagen auf Basis der chemischen Untersuchung
- WEISSBACH, F., L. SCHMIDT und E. HEIN (1974): Method for the anticipation of the run of fermentation silage making, based on the chemical composition of green fodder. Proceedings of the XIIth International Grassland Congress, Moskau, 663-673
- WELLS, J. R. E. (1968): Characterisation of 3 Proteolytic Enzymes from French Beans. *Biochimica Et Biophysica Acta* 167 (2), 388-398
- WIERINGA, G. W. (1958): The effect of wilting on butyric acid fermentation in silage. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 6, 204-210
- WINTERS, A. L., J. E. COCKBURN, M. S. DHANOA und R. J. MERRY (2000): Effects of lactic acid bacteria in inoculants on changes in amino acid composition during ensilage of sterile and nonsterile ryegrass. *Journal of Applied Microbiology* 89 (3), 442-451
- WINTERS, A. L., R. FYCHAN und R. JONES (2001): Effect of formic acid and a bacterial inoculant on the amino acid composition of grass silage and on animal performance. *Grass and Forage Science* 56 (2), 181-192
- WINTERS, A. L., J. D. LLOYD, R. JONES und R. J. MERRY (2002): Evaluation of a rapid method for estimating free amino acids in silages. *Animal Feed Science and Technology* 99 (1-4), 177-187
- WINTERS, A. L. und F. R. MINCHIN (2002): The effect of PPO on the protein content of ensiled red clover. Proceedings of the XIIIth International Silage Conference, Auchincruive, 84
- WOOLFORD, M. K. (1984): The Silage Fermentation. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel
- YEMM, E. W. und E. C. COCKING (1955): The Determination of Amino-Acids with Ninhydrin. *Analyst* 80 (948), 209-213
- ZHU, W. Y., A. H. KINGSTON-SMITH, D. TRONCOSO, R. J. MERRY, D. R. DAVIES, G. PICHARD, H. THOMAS und M. K. THEODOROU (1999): Evidence of a role for plant proteases in the degradation of herbage proteins in the rumen of grazing cattle. *Journal of Dairy Science* 82 (12), 2651-2658
- ZIERENBERG, B. (2000): *In-vitro* Methode zur Beurteilung der Fermentationsleistung von Milchsäurebakterien und deren Einfluss auf die Stoffwechselaktivität weiterer für die Silierung relevanter Mikroorganismen bei unterschiedlichen Fermentationsbedingungen. Dissertation, Universität Rostock
- ZOOK, A. B. (1982): The effects of two levels of dietary protein solubility on lactating cows exposed to heat stress and in thermal neutral environments. Dissertation, Universität Missouri-Columbia



**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 2.1: Zusammensetzung des Gesamtstickstoffs (Gesamt-N) aus Reinproteinstickstoff (Reinprotein-N) und Nichtproteinstickstoff (NPN) von Grünfutter und Silage (nach (REUTER, 1982)) .....	9
Abbildung 4.1: Schema der in-vitro Methode zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität .....	44
Abbildung 4.2: Abhängigkeit des TS-Gehaltes des Presssaftes (PS) vom TS-Gehalt des Ausgangsmaterials (AM) bei unsilierter und silierter Luzerne .....	49
Abbildung 4.3: Anteil des freien Aminosäurenstickstoffs und des Ammoniakstickstoffs am Gesamtstickstoff (Gesamt-N) im Presssaft (PS) von unsilierter frischer Luzerne und den daraus hergestellten Modellsilagen in Abhängigkeit von den Zusätzen .....	79
Abbildung 4.4: Anteil des freien Aminosäurenstickstoffs und des Ammoniakstickstoffs am Gesamtstickstoff (Gesamt-N) im Presssaft (PS) von unsilierter angewelkter Luzerne (Anwelk1: 21,2 % TS) und den daraus hergestellten Modellsilagen in Abhängigkeit von den Zusätzen .....	83
Abbildung 4.5: Anteil des freien Aminosäurenstickstoffs und des Ammoniakstickstoffs am Gesamtstickstoff (Gesamt-N) im Presssaft (PS) von unsilierter angewelkter Luzerne (Anwelk2: 22,5 % TS) und den daraus hergestellten Modellsilagen in Abhängigkeit von den Zusätzen .....	84
Abbildung 4.6: Anteil des freien Aminosäurenstickstoffs und des Ammoniakstickstoffs am Gesamtstickstoff (Gesamt-N) im Presssaft (PS) von unsilierter angewelkter Luzerne (Anwelk3: 27,7 % TS) und den daraus hergestellten Modellsilagen in Abhängigkeit von den Zusätzen .....	87
Abbildung 4.7: Anteil des freien Aminosäurenstickstoffs und des Ammoniakstickstoffs am Gesamtstickstoff (Gesamt-N) im Presssaft (PS) von unsiliertem Klee gras (frisch: 16,7 % TS und angewelkt: 37,9 % TS) und den daraus hergestellten Modellsilagen .....	91
Abbildung 5.1: Veränderung der proteolytischen Aktivität (PA) im Presssaft (PS) von Luzernesilagen (Frisch, Anwelk1, Anwelk2) während der Lagerung (n=126) .....	110
Abbildung 5.2: Anteile des freien Aminosäurenstickstoffs am Gesamtstickstoff im Presssaft von Luzernefrischsilagen in Abhängigkeit von Lagerdauer und	

Silierzusätzen (Melasse = Mel, Milchsäurebakterien und Melasse = MSB+Mel).....	111
Abbildung 5.3: Anteile des Ammonikstickstoffs am Gesamtstickstoff im Presssaft von Luzernefrischsilagen in Abhängigkeit von Lagerdauer und Silierzusätzen (Melasse = Mel, Milchsäurebakterien und Melasse = MSB+Mel).....	113
Abbildung 5.4: Anteil des freien Aminosäurenstickstoffs und des Ammoniakstickstoffs am Gesamtstickstoff (Gesamt-N) im Presssaft (PS) von Modellsilagen aus Klee gras (16,7 % TS) und Luzerne (13,6 % TS) vor (0 d) und nach der Silierung (96 d).....	115
Abbildung 5.5: Proteolytische Aktivität (PA) und ausgewählte Stickstofffraktionen im Presssaft (PS) von diploiden (2n) und tetraploiden (4n) Rotkleesorten im Vegetationsverlauf.....	118

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 2.1:	Bestimmung der Rohproteinfraktionen mit verschiedenen Lösungsmitteln nach dem Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS) (SNIFFEN <i>et al.</i> , 1992; NRC, 2001).....	4
Tabelle 2.2:	Veränderungen ausgewählter Stickstofffraktionen (Gesamtstickstoff: Gesamt-N, Nichtproteinstickstoff: NPN, Ammoniakstickstoff: NH <sub>3</sub> -N, freier Aminosäurenstickstoff: fr. AS-N) durch das Anwelken verschiedener Grünfütterleguminosen.....	11
Tabelle 2.3:	Veränderungen ausgewählter Stickstofffraktionen (Gesamtstickstoff: Gesamt-N, Nichtproteinstickstoff: NPN, Ammoniakstickstoff: NH <sub>3</sub> -N, freier Aminosäurenstickstoff: fr. AS-N) während der Silierung frisch geschnittener Grünfütterleguminosen.....	14
Tabelle 2.4:	Veränderungen ausgewählter Stickstofffraktionen (Gesamtstickstoff: Gesamt-N, Nichtproteinstickstoff: NPN, Ammoniakstickstoff: NH <sub>3</sub> -N, freier Aminosäurenstickstoff: fr. AS-N) während der Silierung angewelkter Grünfütterleguminosen .....	16
Tabelle 2.5:	Optimale pH-Wert-Bereiche verschiedener für die Silierung relevanter proteolytischer Pflanzenenzyme .....	19
Tabelle 2.6:	Bestimmung der proteolytischen Aktivität (PA) bei unterschiedlichen Pflanzen mit verschiedenen Testproteinsubstraten.....	26
Tabelle 4.1:	Verwendetes Pflanzenmaterial und Einteilung nach Versuchsabschnitten.....	30
Tabelle 4.2:	Rotkleesorten im Vegetationsverlauf für Untersuchungen zur Beeinflussbarkeit der proteolytischen Aktivität durch interne Faktoren unter in-vitro Bedingungen.....	31
Tabelle 4.3:	Varianten im Silierversuch mit Luzerne (Erntetermin 13.05.2004); n=3 .....	32
Tabelle 4.4:	Geräteparameter der verwendeten HPLC und GC .....	35
Tabelle 4.5:	Verwendete Stickstofffraktionen im Presssaft (PS) bzw. Extrakt zur Bearbeitung verschiedener Versuchsfragen.....	38
Tabelle 4.6:	Reinprotein-N- und $\alpha$ -Amino-N-Gehalt von Presssaft (PS) aus Luzerne vor und nach einer Inkubation (Ink.) von 24 h bei 40°C (n=6) .....	40
Tabelle 4.7:	Testproteinpräparate (Hersteller und Stickstoffgehalt in % d. Originalsubstanz (OS)) .....	42

Tabelle 4.8:	$\alpha$ -Amino-N-Gehalt der Proteinpräparatlösungen vor und nach Inkubation (n=3) .....	42
Tabelle 4.9:	Einfluss der proteolytischen Aktivität (PA) von Luzernepresssaft (Luzerne-PS) im Vergleich zu einer Modelllösung ohne PA (0,9 %ige NaCl-Lsg.) auf den Reinprotein-N-Gehalt verschiedener Proteinpräparate nach Inkubation (n=3) .....	43
Tabelle 4.10:	Eigenproteolyse ( $PL_{\text{eigenTPL}}$ ) der Testproteinlösung (TPL) nach Inkubation mit Modelllösung (NaCl) bei 40°C.....	45
Tabelle 4.11:	Gesamtproteolyse ( $PL_{\text{ges}}$ = Inkubation PS mit TPL) und Eigenproteolyse des PS ( $PL_{\text{eigenPS}}$ ) nach Inkubation bei 40°C .....	45
Tabelle 4.12:	Charakterisierung von Presssaft (PS) und Presskuchen (PKu) je kg Ausgangsmaterial (unsilierte und silierte Luzerne) in Abhängigkeit vom Anwelkgrad und dem Pressdruck.....	47
Tabelle 4.13:	Veränderung ausgewählter N-Fractionen im Ausgangsmaterial bei unsilierter Luzerne (a) und siliertes (48 d) Luzerne (b) unter dem Einfluss des Anwelkens (n=3).....	50
Tabelle 4.14:	Einfluss von Anwelkgrad und Pressdruck auf die N-Fractionen im Presssaft (PS) bei unsilierter Luzerne (a) und siliertes (48 d) Luzerne (b) (n=3) .....	52
Tabelle 4.15:	Einfluss von Anwelkgrad und Pressdruck auf Gesamt-N-Gehalte in den Presskuchen (PKu) von unsilierter und siliertes Luzerne (n=3) .....	53
Tabelle 4.16:	Charakterisierung des Gesamt-N-Gehaltes je kg Ausgangsmaterial (unsilierte und silierte Luzerne) im Presssaft (PS) und Presskuchen (PKu) in Abhängigkeit vom Anwelkgrad und dem Pressdruck .....	54
Tabelle 4.17:	Einheiten zur Angabe der proteolytischen Aktivität aus der Literatur.....	56
Tabelle 4.18:	Veränderung der Gesamt-N-Konzentration im Presssaft (PS) und Vergleich zweier Bezugseinheiten zur Angabe der proteolytischen Aktivität (PA) im PS aus Luzerne (Erntetermin 19.08.2004) im Verlauf des Anwelkens (n=3) .....	57
Tabelle 4.19:	Einfluss des pH-Wertes auf den $\alpha$ -Amino-N-Gehalt von Luzerneextrakten (0 h-Wert eingestellt mit Milchsäure) nach 46 h Inkubation bei 30°C (n=3).....	59
Tabelle 4.20:	Einfluss der Osmolalität auf den $\alpha$ -Amino-N-Gehalt von Luzerneextrakten nach 46 h Inkubation bei 30°C (n=3) .....	60

Tabelle 4.21: Einfluss des Anfangs-pH-Wertes und der Osmolalität auf den $\alpha$ -Amino-N-Gehalt von Luzerneextrakten nach 46 h Inkubation bei 30°C (n=3).....	61
Tabelle 4.22: Einfluss der Temperatur auf den $\alpha$ -Amino-N-Gehalt von Luzerneextrakten nach 46 h Inkubation (n=3).....	62
Tabelle 4.23: Einfluss des Ausgangs-pH-Wertes, der Temperatur und der Osmolalität auf den $\alpha$ -Amino-N-Gehalt von Luzerneextrakten nach 46 h Inkubation (n=3) .....	63
Tabelle 4.24: Einfluss von Milchsäurebakterien (MSB) und MSB mit Zucker auf den $\alpha$ -Amino-N-Gehalt von Luzerneextrakten nach 46 h Inkubation bei 30°C (n=3) .....	64
Tabelle 4.25: Einfluss von Tanninen auf den $\alpha$ -Amino-N-Gehalt von Luzerneextrakten nach 46 h Inkubation bei 30°C (n=3) .....	65
Tabelle 4.26: Veränderung der $\alpha$ -Amino-N-Gehalte von Luzerneextrakten ohne und mit Behandlung mit Thiomersal nach 46 h Inkubation bei 30°C (n=3) .....	66
Tabelle 4.27: Einfluss des Vegetationsstadiums auf die proteolytische Aktivität (PA) im Presssaft von vier Rotkleesorten (n=3).....	67
Tabelle 4.28: Einfluss des Vegetationsstadiums auf die proteolytische Aktivität (PA) im Presssaft von Rotklee (n=12).....	68
Tabelle 4.29: Einfluss verschiedener Aufwüchse auf die proteolytische Aktivität (PA) im Presssaft (PS) von 10 Rotkleesorten (n=3).....	69
Tabelle 4.30: Einfluss verschiedener Aufwüchse auf die proteolytische Aktivität (PA) im Presssaft (PS) von Rotklee .....	69
Tabelle 4.31: Vergleich von Stickstofffraktionen und proteolytischer Aktivität (PA) im Presssaft (PS) aus diploiden und tetraploiden Rotkleesorten (n=48) .....	70
Tabelle 4.32: Charakterisierung des Pflanzenmaterials zur Herstellung der Modellsilagen .....	72
Tabelle 4.33: Einfluss des Anwelkens auf den TS-Gehalt und den Gehalt ausgewählter N-Fractionen im Ausgangsmaterial und Presssaft von Luzerne (n=3) .....	73
Tabelle 4.34: Einfluss des Anwelkens auf den TS-Gehalt und den Gehalt ausgewählter N-Fractionen im Ausgangsmaterial und Presssaft von Klee gras .....	74
Tabelle 4.35: Abhängigkeit der proteolytischen Aktivität (PA) im Presssaft (PS) aus Luzerne (n=3) und Klee gras vom Anwelkgrad .....	74
Tabelle 4.36: pH-Werte während des Anwelkens in Luzerne- und Klee graspresssaft .....	75

Tabelle 4.37: Veränderung des pH-Wertes im Presssaft (PS) von Luzernefrischsilagen während der Silierung mit unterschiedlichen Silierzusätzen (n=3).....	77
Tabelle 4.38: Gehalt an TS und ausgewählten N-Fractionen im silierten Ausgangsmaterial (Luzernefrischsilagen mit verschiedenen Silierzusätzen) und Veränderung dieser Parameter im Presssaft während des Silierens .....	78
Tabelle 4.39: Veränderung des pH-Wertes im Presssaft (PS) von Luzerneanwelksilagen (Anwelk1 und 2) während der Silierung mit und ohne Silierzusatz (n=3).....	80
Tabelle 4.40: Gehalt an TS und ausgewählten N-Fractionen im silierten Ausgangsmaterial (Luzerneanwelksilagen, 2 Feldliegezeiten, ohne und mit Silierzusatz) und Veränderung dieser Parameter im Presssaft während des Silierens .....	82
Tabelle 4.41: Veränderung des pH-Wertes im Presssaft (PS) von Luzerneanwelksilagen (Anwelk3) während der Silierung ohne und mit Silierzusatz (n=3).....	85
Tabelle 4.42: Gehalt an TS und ausgewählten N-Fractionen im Ausgangsmaterial (Luzerneanwelksilagen, längste Feldliegezeit, ohne und mit Silierzusatz) und Veränderung dieser Parameter im Presssaft während des Silierens .....	86
Tabelle 4.43: Reinprotein-N-Gehalte und Anteil des Reinprotein-N am Gesamt-N von unterschiedlich angewelkten Modellsilagen aus Luzerne nach 96 Tagen Silierdauer in Abhängigkeit von der Behandlung (n=3).....	88
Tabelle 4.44: Veränderung des pH-Wertes im Presssaft (PS) von Klee gras Frisch- und Anwelksilagen während der Silierung (n=3).....	89
Tabelle 4.45: Gehalt an TS und ausgewählten N-Fractionen im Ausgangsmaterial (Silagen aus frischem und angewelktem Klee gras) und Veränderung dieser Parameter im Presssaft während des Silierens .....	90
Tabelle 4.46: Veränderung der proteolytischen Aktivität (PA) im Presssaft (PS) während der Silierung von Luzerne mit unterschiedlichen Omolalitäten (n=3) .....	92
Tabelle 4.47: Charakterisierung von Hornklee (zur Herstellung von Mischmodellsilagen mit Luzerne) .....	93

Tabelle 4.48:	TS- und Gesamt-N-Gehalt der Ausgangsmaterialien zur Bereitung der Silagen (Luzerne- und Mischmodellsilagen) (n=3).....	94
Tabelle 4.49:	Vergleich des TS-Gehaltes und des Gehaltes ausgewählter N-Fractionen in Ausgangsmaterial und Presssaft von Luzerne- und Mischsilagen ohne und mit Behandlung (n=3).....	94
Tabelle 4.50:	Vergleich der Anteile des freien Aminosäurenstickstoff und Ammoniakstickstoff am Gesamt-N im Presssaft (PS) von Luzerne- und Mischsilagen ohne und mit Behandlung (n=3).....	95
Tabelle 5.1:	Beeinflussung der Anteile von freiem Aminosäurenstickstoff (fr. AS-N) und Ammoniakstickstoff (NH <sub>3</sub> -N) am Gesamtstickstoff (Gesamt-N) im Presssaft (PS) durch Anwelkgrad und Behandlung von Luzernesilagen während einer Lagerung von 96 Tagen (n=21) .....	107
Tabelle 5.2:	Abhängigkeit der Anteile des freien Aminosäurenstickstoffs (fr. AS-N) und Ammoniakstickstoffs (NH <sub>3</sub> -N) am Gesamtstickstoff (Gesamt-N) im Presssaft (PS) von der Lagerzeit (x in Tagen) unterschiedlich angewelkter und behandelter Luzernesilagen (n=21).....	109
Tabelle 5.3:	Variationskoeffizienten [%] der logarithmischen Regressionen (Gleichungen Nummer 23 bis 40 aus Tabelle 5.2) für die Anteile des freien Aminosäurenstickstoffs (fr. AS-N) bzw. des Ammoniakstickstoffs (NH <sub>3</sub> -N) am Gesamtstickstoff (Gesamt-N) im Presssaft (PS).....	112
Tabelle 5.4:	Gesamtstickstoffgehalte im Pflanzenmaterial und im Presssaft von Luzerne und Klee gras .....	115

## Anhang



## A. Ergänzungen zur Literaturübersicht

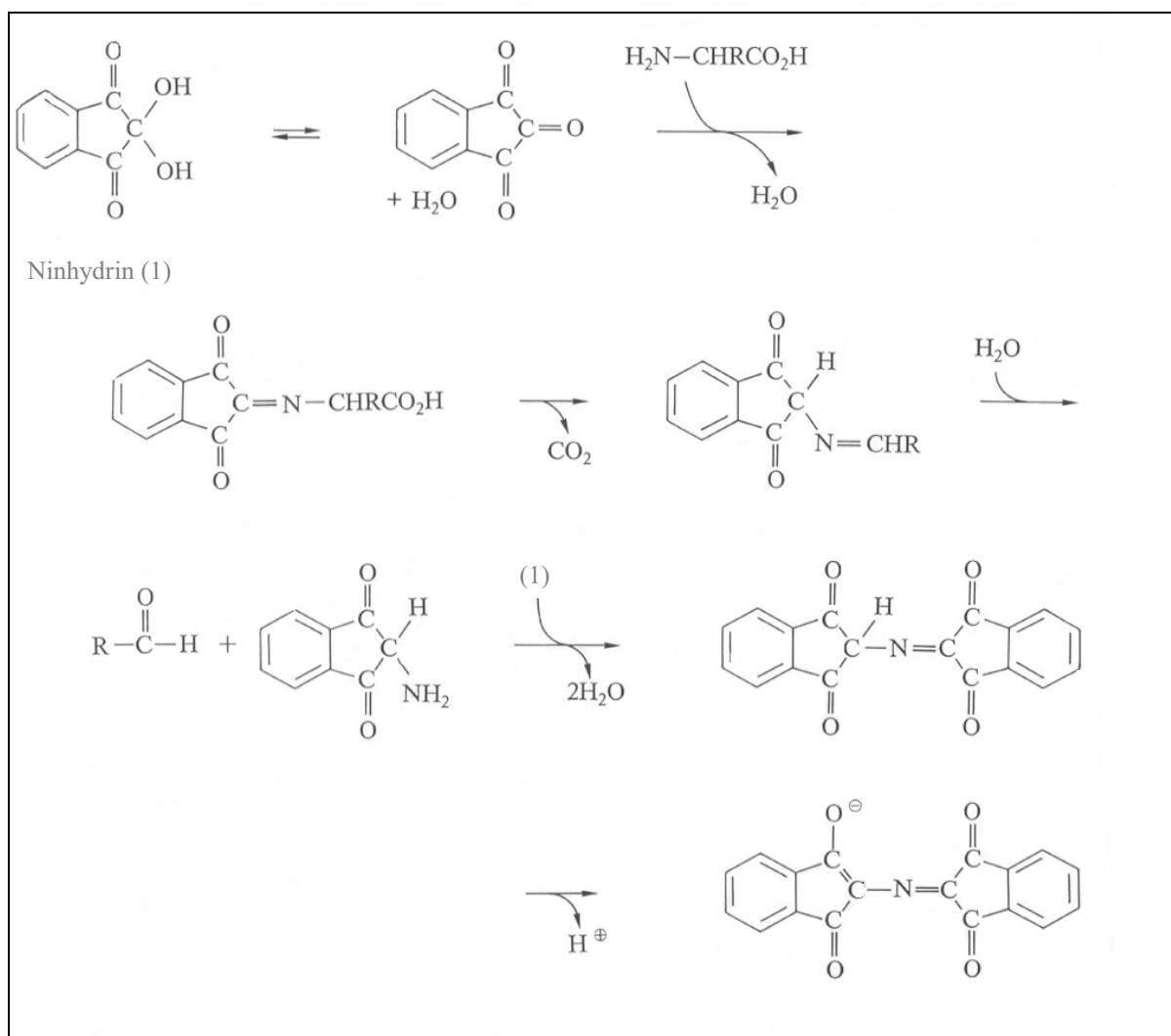


Abbildung A.1: Ninhydrin-Reaktion nach DOSE (1996)

Tabelle A.1: Übersicht von ausgewählten Methoden zur Bestimmung der Aktivität unterschiedlicher Enzyme

Enzym Enzymquelle	Substrat	Messprinzip	Angabe der Enzymaktivität	Quelle
$\alpha$ -Chymotrypsin <i>Pancreas Rind</i>	Myoglobin (Pferdeherz) Glycinin (Soja)	Inkubation von Enzymlösungen mit verschiedenen Substratmengen bei 35°C, Fällung mit 20 %iger TCE nach 7 Zeiten (max. 60 min), Zentrifugation, Messung der TCE-löslichen Peptide mit RP-HPLC	Freisetzung von 1 $\mu$ mol TCE-löslicher Peptide pro min (Substrat: Glycinin)	ROHN et al., 2003
Polyphenoloxidasen: Tyrosin Hydroxylase DOPA Oxidase Dimethoxyphenol Oxidase Ascorbat Oxidase <i>Ralsonia solanacearum</i>	L-Tyrosin L-DOPA Dimethoxyphenol L-Ascorbat	Oxidation zu Dopachrom, Tetramethoxydiphenylquinon, Dehydroascorbat, Messung der Abnahme der Absorption bei 475, 468 und 245 nm	1 Unit katalysiert 1 $\mu$ mol des Produktes je min	HERNÁNDEZ-ROMERO et al., 2005
Polygalacturonase <i>Botrytis cinerea</i>	Polygalacturonsäure	Inkubation bei 30°C, Anwendung der 2-Cyanoacetamid Spektrophotometrie	1 Unit setzt 1 $\mu$ mol Galacturonsäure je min aus der Polygalacturonsäure frei	POINSSOT et al., 2003
Phosphatase <i>Boden</i>	p-Nitrophenyl Phosphat	Inkubation für 1 h bei 37°C, Reaktion mit CaCl <sub>2</sub> -NaOH stoppen, Entwicklung der gelben Farbe, Freisetzung von p-Nitrophenol, Messung photometrisch mit Standardvergleich bei 400 nm	Freisetzung von p-Nitrophenol in $\mu$ mol je g Boden	TABATABAI und BREMNER, 1969
Catalase	Hydrogen Peroxid	Abnahme des Hydrogen Peroxids photometrisch bei 240 nm	1 Unit: Abbau von 1 $\mu$ mol Hydrogen Peroxid je min	DHINDSA et al., 1981
Superoxid Dismutase <i>Tabakblätter</i>	Nitro Blau Tetrazolium	Zugabe von Riboflavin unter Fluoreszenzlampe für 10 min, Messung der Absorption bei 560 nm, unbestrahlte Variante als Kontrolle	1 Unit inhibiert 50 % der Reaktion	

Fortsetzung Tabelle A.1:

<b>Enzym</b> <i>Enzymquelle</i>	<b>Substrat</b>	<b>Messprinzip</b>	<b>Angabe der Enzymaktivität</b>	<b>Quelle</b>
Protease <i>Petunia Corollas</i>	Azocasein	Inkubation bei 37°C für 5 h, Beendung der Reaktion mit 10 % TCA, Mischen und 15 min bei Raumtemp., Zentrifugation (8 min bei 8000g) Blanks: Inkubation von Enzym und Substrat getrennt, TCA-Zugabe, danach Substrat zu Enzymprobe, Messung der Absorption bei 490 nm	1 Unit: Veränderung der Absorption um 0,01 Einheiten je h bei 490 nm	JONES et al., 2005
Lipogenase <i>Lupinensaat</i>	Fettsäuren: Arachidonsäure, Linolensäure Linolsäure	Inkubation bei 24°C, Bildung von konjugierten Dienen, spektrophotometrische Bestimmung bei 235 nm	1 Unit: Enzymmenge, die je min 1 nmol Produkt produziert, Angabe in Bezug zu Proteingehalt, Produkte wurden mit GC/MS analysiert und mit HPLC quantifiziert	BENEYTOU et al., 1988
Guaiacol Peroxidase	Guaiacol	Reaktionsstart mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Messung des Absorptionsanstieges bei 470 nm	1 µmol Tetraguaiacol Produktion je sec.	
Ascorbate Peroxidase (APX)	Ascorbat	Reaktionsstart mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Messung des Absorptionsänderung bei 290 nm während 1 min = Totale APX Aktivität 10 min Ink. mit p-Chloromercurisulfonsäure = Unspezifische APX Aktivität	1 µmol Ascorbat Verbrauch je sec. (Totale APX Akt. - Unspezifische APX Aktivität)	CHERNIKOVA et al., 2000
Gluthathione Reductase <i>Sojablätter</i>	Oxidiertes Glutathion (OG)	Inkubationsstart durch Zugabe von NADPH bei 30°C, Messung des Absorptionsabfalls bei 340 nm, Kontrolle ohne OG	1 µmol oxidiert NADPH je sec. (Total mit OG - ohne OG)	

## B. Herstellerinformation des Testproteinpräparates Pisane

Pisane HD der belgischen Firma Coscura wird in Deutschland über die Georg Breuer GmbH vertrieben. Es handelt sich um ein Erbsenproteinisolat, das durch Wasserextraktion aus getrockneten Erbsen gewonnen wird. Während des Herstellungsprozesses werden kleine Peptide und freie Aminosäuren entfernt. Das getrocknete Präparat (95 ( $\pm$ 2) % TS) ist gut löslich, der pH-Wert einer 10%igen Lösung beträgt 7,8  $\pm$ 0,5. Tabelle B.1 zeigt die Inhaltsstoffe nach Herstellerangaben.

Tabelle B.1: Inhaltsstoffe laut Herstellerangaben von Pisane

Inhaltstoff	Gehalt [% der TS]
Protein (N x 6,25)	90 $\pm$ 2
Fett (Petroleum Aether)	max 0,5
Asche	5 $\pm$ 1
Natrium	0,7
Kalzium	0,15
Phosphor	0,52
Magnesium	0,2
Kalium	0,4
Kohlenhydrate	max 4,5
Aminosäuregehalt	g/100 g Protein
- Glycin	4,6
- Alanin	4,7
- Valin	5,2
- Leucin	8,0
- Isoleucin	4,6
- Serin	5,4
- Threonin	4,1
- Tyrosin	4,1
- Asparaginsäure	12,3
- Phenylalanin	5,5
- Tryptophan	1,0
- Prolin	4,5
- Methionin	1,1
- Cystin	1,2
- Lysin	8,2
- Histidin	2,8
- Arginin	9,0
- Glutaminsäure	19,8

## **C. Methodenvorschrift zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität in Presssäften**

Die hydrolytische Spaltung von Proteinen findet in der wässrigen Phase von Pflanzen und Silagen statt. Um die proteolytischen Aktivitäten unterschiedlicher Pflanzen vergleichen zu können, erfolgt die Quantifizierung mit Hilfe einer einheitlichen Testproteinlösung. Die enzymatisch wirksame Substanz (Presssaft) hydrolysiert das Protein und setzt  $\alpha$ -Amino-N frei. Die Freisetzung wird als proteolytische Aktivität des Presssaftes gewertet.

### ***Herstellung des Presssaftes***

Das Pflanzenmaterial wird sofort nach dem Schnitt gehäckselt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Dies bewirkt nach GREENHILL (1964a) eine vollständige Zerstörung der Zellwände und verbessert somit den Austritt des Zellsaftes. Nach dem Auftauen wird aus dem Pflanzenmaterial mit einer Tinkturenpresse bei  $100\text{ kp/cm}^2$  Presssaft abgepresst. Bis zur Analyse wird der Presssaft bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### ***Verfahren zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität***

#### **Benötigte Chemikalien**

1. 0,9 %ige NaCl-Lösung
2. Thiomersal
3. Testproteinpräparat (Pisane®, Erbsenproteinisolat, COSUCRA A:S., Belgien)
4. 15 %ige Trichloressigsäure
5. destilliertes Wasser
6. 0,01 M NaCN-Lösung (490 mg/l) (Merck 1.06437)
7. Acetatpuffer: 2700 g Natriumacetattrihydrat (Merck 1.06265) + 2 l destilliertes Wasser + 500 ml Eisessig (Merck 1.00062), auf 7,5 l auffüllen mit destilliertes Wasser
8. Ninhydrin-Lösung: 3 % Ninhydrin (Merck 1.06762) in Ethylenglycolmonomethylether (Merck 1.15118).
9. Isopropanol (Merck 1.09634)–Wasser Lösung: 1:1
10. Glycin-Lösung (Merck 1.04169): 267,9 mg Glycin in 100 ml 0,125 n HCl (500  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -Amino-N/ml)

#### **Benötigte Messgeräte und Materialien**

1. 50 ml Erlenmeyerkolben
2. Aluminiumfolie
3. Brutschrank ( $40^{\circ}\text{C}$ )
4. Filterpapier (mittelfein, 80 g/m<sup>2</sup>, Sartorius AG)
5. 100 ml Messkolben
6. Reagenzgläser mit Schliffstopfen
7. Reagenzglasschüttler (Vortex Genie 2)
8. Wasserbad ( $100^{\circ}\text{C}$ )
9. Photometer (Spectronic Genesys 5 von Milton Roy)
10. Küvetten (Einmalküvetten Merck 634-8111)

Von dem im Wasserbad schonend aufgetauten Presssaft werden 5 ml zu (a) 20 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung (versetzt mit 20 mg Thiomersal/100 ml Lösung zur Unterbindung mikrobieller Umsätze) zur Bestimmung der Eigenproteolyse des Presssaftes ( $PL_{\text{eigenPS}}$ ) und (b) zu 20 ml Testproteinlösung (1,5 % Testproteinpräparat in 0,9 %iger NaCl-Lösung mit 20 mg Thiomersal/100 ml Lösung) zur Bestimmung der Gesamtproteolyse ( $PL_{\text{ges}}$ ) in 50 ml Erlenmeyerkolben gegeben. Es wird mit je drei Parallelen gearbeitet. Die Kolben werden mit Aluminiumfolie abgedeckt für 24 Stunden in einen Brutschrank bei 40°C gestellt. Nach der Inkubation erfolgt die Fällung des nicht hydrolysierten Proteins mit 5 ml 15 %iger Trichloressigsäure. Nach einstündiger Einwirkzeit wird der Niederschlag durch mittelfines Filterpapier abfiltriert, im Filtrat erfolgt die Bestimmung des  $\alpha$ -Amino-N nach ROSEN (1957). 1 ml des Filtrates wird mit 9 ml destilliertem Wasser in einem Reagenzglas verdünnt. Nach gewissenhaftem Vermischen mit dem Reagenzglasschüttler wird je nach erwartetem  $\alpha$ -Amino-N-Gehalt 1, 0,5 (Zugabe von 0,5 ml aqua dest.) oder 0,2 ml (Zugabe von 0,8 ml aqua dest.) entnommen und in ein vorbereitetes Reagenzglas pipettiert. Zu der Probe werden 0,5 ml Zyanid-Acetat-Puffer (20 ml NaCN-Lösung mit Acetatpuffer auffüllen auf 1 l) und 0,5 ml 3 %ige Ninhydrin-Lösung gegeben. Die Reagenzgläser werden mit einem Schliffstopfen verschlossen, der Inhalt mit dem Reagenzglasschüttler gemischt und für 15 min in ein kochendes Wasserbad gestellt. Sofort nach der Entnahme aus dem Wasserbad werden 10 ml Isopropanol-Wasser Lösung dazugegeben, gut vermischt und im kalten Wasserbad auf Raumtemperatur (30 min) gekühlt. Im Photometer wird die Extinktion der Proben bei 570 nm gemessen.

#### *Eichreihe*

Von der Glycin-Lösung werden 1, 2, 3, 4 und 5 ml in 100 ml Messkolben pipettiert und mit aqua dest. aufgefüllt (Eichlösung). Daraus wird je 1 ml wie eine Probe behandelt. Zur Ermittlung des Blindwertes wird statt der hergestellten Glycin-Lösungen 1 ml destilliertes Wasser in das Reagenzglas gegeben und ebenfalls wie eine Probe behandelt. Die Eichreihe wird für jede Probenmessung erneut hergestellt und gemessen.

#### *Korrekturwert Testproteinlösung (TPL)*

Um die Eigenproteolyse der Testproteinlösung ( $PL_{\text{eigenTPL}}$ ) bei der Berechnung der Proteolytischen Aktivität der Presssäfte zu beachten, muss ein Korrekturwert ermittelt werden. Hierfür werden (c) zu 20 ml Testproteinlösung 5 ml 0,9 %ige NaCl-Lösung als Modelllösung für einen Presssaft ohne proteolytische Aktivität gegeben. Es erfolgt analog zu der Probenbehandlung die Inkubation, die Fällung mit 5 ml 15 %iger Trichloressigsäure und

das Filtrieren. Von dem Filtrat wird ebenfalls 1 ml mit 9 ml destilliertes Wasser im Reagenzglas verdünnt. Daraus wird 1 ml mit Ninhydrin (siehe oben) angefärbt und bei 570 nm gemessen.

### Berechnung

Aus den Extinktionen der Eichreihe wird eine lineare Gleichung mit Schnittpunkt durch den Ursprung errechnet (siehe Beispiel).

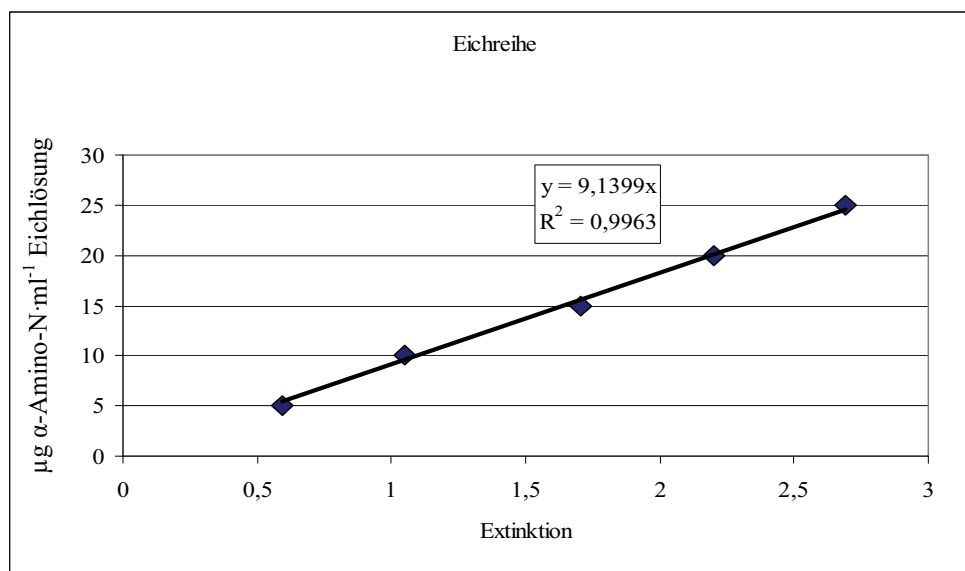


Abbildung C.1: Beispieleichreihe mit 5 Glycin-Lösungen

In die Gleichung (im Beispiel  $y = 9,1399 \cdot x$ ) werden die gemessenen Extinktionen der Proben eingesetzt. Aus den Verdünnungen ergibt sich folgende Berechnung der  $\alpha$ -Amino-N-Gehalte je ml Presssaft:

$$\begin{aligned}
 [1] \text{ µg } \alpha\text{-Amino-N/ml Presssaft} &= 9,1399 \cdot \text{Extinktion} \\
 &\quad \cdot 60 \text{ (bei 1,0 ml Probe zum Kochen)} \\
 &\quad \cdot 120 \text{ (bei 0,5 ml Probe zum Kochen)} \\
 &\quad \cdot 300 \text{ (bei 0,2 ml Probe zum Kochen)}
 \end{aligned}$$

Der  $\alpha$ -Amino-N Gehalt wird mit den gemessenen Extinktionen für die drei Varianten ( $PL_{\text{eigenPS}}$ ,  $PL_{\text{ges}}$  und  $PL_{\text{eigenTPL}}$ ) errechnet.

Die proteolytische Aktivität (PA) wird aus der Differenz der drei  $\alpha$ -Amino-N-Gehalte berechnet:

$$[2] \text{ PA} = PL_{\text{ges}} - PL_{\text{eigenPS}} - PL_{\text{eigenTPL}} \text{ [mg freigesetzter } \alpha\text{-Amino-N aus der TPL/ml Presssaft]}$$

Die so ermittelten Werte werden auf den im Presssaft enthaltenen Gesamt-N bezogen, so dass die Bezugsgröße mg freigesetzter  $\alpha$ -Amino-N aus der TPL/g Gesamt-N im PS angegeben wird.

**D. Ergebnistabellen**

Tabelle D.1: Einfluss von Anwelkgrad und Pressdruck auf TS-Gehalte in den Presskuchen (PKu) von unsilierter und silierter Luzerne (n=3)

	Anwelk- stufe	Druck [kp/cm <sup>2</sup> ]	TS des PKu [%]		Anwelk- stufe	Druck [kp/cm <sup>2</sup> ]	TS des PKu [%]
unsilierter Luzerne	F	60	39,10 ±1,45	silierter Luzerne	SF	60	38,40 ±1,49
		120	41,81 ±0,64			120	40,35 ±3,14
	A1	60	40,77 ±0,17		SA1	60	39,99 ±0,63
		120	41,90 ±1,14			120	42,08 ±0,68
	A2	60	41,90 ±0,59		SA2	60	43,35 ±0,81
		120	44,18 ±0,77			120	46,08 ±0,17
	A3	60	45,85 ±0,42		SA3	60	49,37 ±0,62
		120	46,89 ±0,45			120	49,35 ±0,24

Tabelle D.2: pH-Werte wässriger Aufgüsse von Luzerne nach Einstellung verschiedener Anfangs-pH-Werte mit Milchsäure während Inkubation bei 30°C (n=3)

Inkuba- tionszeit	eingestellter Anfangs-pH-Wert											
	pH 5,9*		pH 4,8		pH 4,4		pH 4,2		pH 4,0		pH 3,8	pH 3,6
0 h	5,95 ±0,01		4,78 ±0,03		4,40 ±0,02		4,19 ±0,01		4,00 ±0,01		3,82 ±0,03	3,60 ±0,02
14 h	5,08 ±0,09		4,92 ±0,05		4,63 ±0,03		4,41 ±0,02		4,26 ±0,04		4,04 ±0,02	3,81 ±0,02
18 h	4,71 ±0,08		4,55 ±0,02		4,57 ±0,02		4,40 ±0,03		4,26 ±0,05		4,04 ±0,02	3,83 ±0,02
22 h	4,65 ±0,07		4,38 ±0,02		4,33 ±0,03		4,40 ±0,01		4,26 ±0,04		4,03 ±0,03	3,82 ±0,02
26 h	4,67 ±0,04		4,26 ±0,02		4,18 ±0,04		4,24 ±0,02		4,23 ±0,02		4,02 ±0,03	3,82 ±0,03
38 h	4,76 ±0,03		4,40 ±0,03		4,14 ±0,05		3,96 ±0,01		3,89 ±0,04		3,94 ±0,02	3,82 ±0,02
46 h	4,78 ±0,03		4,50 ±0,03		4,23 ±0,05		4,05 ±0,02		3,96 ±0,03		3,79 ±0,01	3,83 ±0,02

\* Kontrolle ohne Milchsäure

Tabelle D.3: pH-Werte wässriger Aufgüsse von Luzerne nach Einstellung verschiedener Osmolalitäten mit KCl-Lösungen während Inkubation bei 30°C (n=3)

Inkuba- tionszeit	eingestellte Osmolalität [osmol/kg]											
	0,08*		0,5		1,0		1,5		2,0		2,5	3,0
0 h	6,00 ±0,01		5,82 ±0,01		5,81 ±0,05		5,74 ±0,02		5,72 ±0,01		5,68 ±0,01	5,67 ±0,01
14 h	4,81 ±0,02		4,85 ±0,01		4,91 ±0,02		5,00 ±0,02		5,54 ±0,02		5,59 ±0,01	5,59 ±0,01
18 h	4,74 ±0,01		4,78 ±0,02		4,83 ±0,01		4,90 ±0,02		5,25 ±0,05		5,56 ±0,01	5,58 ±0,00
22 h	4,70 ±0,01		4,70 ±0,02		4,69 ±0,01		4,84 ±0,02		4,94 ±0,02		5,49 ±0,01	5,56 ±0,01
26 h	4,72 ±0,02		4,71 ±0,01		4,69 ±0,02		4,75 ±0,00		4,87 ±0,02		5,35 ±0,03	5,53 ±0,02
38 h	4,80 ±0,04		4,75 ±0,03		4,73 ±0,03		4,63 ±0,03		4,64 ±0,02		4,87 ±0,01	5,19 ±0,03
46 h	4,88 ±0,03		4,81 ±0,05		4,74 ±0,05		4,63 ±0,03		4,55 ±0,02		4,78 ±0,03	4,98 ±0,02

\* Kontrolle ohne KCl-Lösung



Tabelle D.4: pH-Werte wässriger Aufgüsse von Luzerne nach Einstellung verschiedener Anfangs-pH-Werte mit Milchsäure und Osmolalitäten mit KCl-Lösungen während Inkubation bei 30°C (n=3)

Inkuba- tionszeit	pH 4,4		pH 4,0	
	0,5 osmol/kg	2,0 osmol/kg	0,5 osmol/kg	2,0 osmol/kg
0 h	4,37 ±0,07	4,51 ±0,03	3,97 ±0,03	3,98 ±0,02
14 h	4,71 ±0,09	4,69 ±0,03	4,29 ±0,02	4,22 ±0,01
18 h	4,63 ±0,01	4,69 ±0,03	4,29 ±0,02	4,23 ±0,02
22 h	4,34 ±0,10	4,69 ±0,03	4,29 ±0,02	4,23 ±0,02
26 h	4,16 ±0,06	4,69 ±0,03	4,29 ±0,03	4,23 ±0,02
38 h	4,22 ±0,03	4,15 ±0,03	3,88 ±0,03	4,22 ±0,01
46 h	4,25 ±0,05	4,02 ±0,01	3,92 ±0,03	4,14 ±0,10

Tabelle D.5: pH-Werte wässriger Aufgüsse von Luzerne während Inkubation bei verschiedenen Temperaturen (n=3)

Inkuba- tionszeit	Temperatur [°C]				
	20	30	40	50	60
0 h	5,97 ±0,01	5,96 ±0,01	5,96 ±0,01	5,97 ±0,02	5,98 ±0,03
14 h	5,82 ±0,01	5,08 ±0,09	4,80 ±0,07	5,67 ±0,01	5,56 ±0,01
18 h	5,81 ±0,03	4,71 ±0,08	4,51 ±0,04	4,72 ±0,09	5,01 ±0,10
22 h	5,60 ±0,11	4,65 ±0,07	4,52 ±0,04	4,45 ±0,03	4,69 ±0,03
26 h	5,04 ±0,07	4,67 ±0,04	4,54 ±0,04	4,46 ±0,03	4,63 ±0,06
38 h	4,69 ±0,04	4,76 ±0,03	4,73 ±0,07	4,45 ±0,02	4,69 ±0,10
46 h	4,68 ±0,03	4,78 ±0,03	4,79 ±0,07	4,43 ±0,03	4,69 ±0,10

Tabelle D.6: pH-Werte wässriger Aufgüsse von Luzerne nach Einstellung verschiedener Anfangs-pH-Werte mit Milchsäure und Osmolalitäten mit KCl-Lösungen während Inkubation bei 50°C (n=3)

Inkuba- tionszeit	pH 4,4		pH 4,0	
	0,5 osmol/kg	2,0 osmol/kg	0,5 osmol/kg	2,0 osmol/kg
0 h	4,37 ±0,07	4,51 ±0,03	3,97 ±0,03	3,98 ±0,02
14 h	4,72 ±0,02	4,68 ±0,03	4,16 ±0,01	4,23 ±0,08
18 h	4,71 ±0,03	4,68 ±0,04	4,18 ±0,01	4,23 ±0,06
22 h	4,55 ±0,15	4,65 ±0,02	4,18 ±0,02	4,23 ±0,06
26 h	4,23 ±0,07	4,69 ±0,02	4,18 ±0,04	4,24 ±0,05
38 h	4,06 ±0,01	4,21 ±0,13	4,10 ±0,06	4,21 ±0,07
46 h	4,08 ±0,02	4,07 ±0,01	4,09 ±0,09	4,23 ±0,06

Tabelle D.7: pH-Werte wässriger Aufgüsse von Luzerne mit verschiedenen Zusätzen während Inkubation bei 30°C (n=3)

Inkuba- tionszeit	Zusatz					
	ohne		MSB*		MSB + Zucker	
0 h	6,00	±0,01	5,97	±0,01	6,00	±0,01
14 h	4,81	±0,02	4,72	±0,01	5,62	±0,08
18 h	4,74	±0,01	4,67	±0,02	4,52	±0,16
22 h	4,70	±0,01	4,71	±0,03	4,12	±0,15
26 h	4,72	±0,02	4,81	±0,03	3,90	±0,11
38 h	4,80	±0,04	4,86	±0,02	3,83	±0,05
46 h	4,88	±0,03	4,86	±0,02	3,81	±0,02

\* Milchsäurebakterien

Tabelle D.8: pH-Werte wässriger Aufgüsse von Luzerne nach Zugabe verschiedener Tanninzusätze während Inkubation bei 30°C (n=3)

Tanninzusatz [% der FM]														
Inkuba- tionszeit	Quebracho								Tanninsäure					
	ohne		0,5		1,5		2,5		0,5		1,5		2,5	
0 h	6,00	±0,01	6,08	±0,01	6,10	±0,01	6,02	±0,01	6,00	±0,01	5,70	±0,01	5,48	±0,01
14 h	4,81	±0,02	5,90	±0,04	5,87	±0,07	5,87	±0,05	5,92	±0,05	5,64	±0,03	5,51	±0,03
18 h	4,74	±0,01	5,24	±0,14	5,68	±0,03	5,57	±0,47	5,82	±0,07	5,78	±0,02	5,52	±0,03
22 h	4,70	±0,01	4,86	±0,06	5,08	±0,22	5,24	±0,18	5,70	±0,08	5,81	±0,03	5,57	±0,07
26 h	4,72	±0,02	4,83	±0,08	4,97	±0,22	4,87	±0,11	5,39	±0,27	5,72	±0,04	5,63	±0,09
38 h	4,80	±0,04	4,84	±0,06	4,97	±0,16	4,91	±0,12	5,03	±0,02	5,39	±0,16	5,57	±0,04
46 h	4,88	±0,03	4,87	±0,05	4,97	±0,14	4,93	±0,05	5,01	±0,03	5,34	±0,23	5,50	±0,08

Tabelle D.9: Einfluss des Vegetationsstadiums auf den TS-Gehalt und auf ausgewählte Stickstofffraktionen im Ausgangsmaterial und Presssaft von verschiedenen Rotkleesorten (n=3)

Vegetationsstadium	Sorte (Ploidiestufe)							
	Diplomat (2n)		Pirat (2n)		Mars (4n)		Maro (4n)	
Ausgangsmaterial für die Presssaftgewinnung								
	TS [%]							
vor Knospe	12,94	±0,23	13,86	±0,51	15,61	±0,09	15,64	±0,09
Beginn Knospe	13,22	±0,15	13,41	±0,37	12,75	±0,16	14,78	±0,53
Beginn Blüte	18,52	±0,43	17,86	±0,09	15,94	±0,07	16,24	±0,43
Blüte	20,84	±0,31	20,71	±0,12	18,25	±0,42	18,69	±0,34
	Gesamt-N [% der TS]							
vor Knospe	2,91	±0,09	4,10	±0,03	3,51	±0,02	3,58	±0,03
Beginn Knospe	3,22	±0,18	3,35	±0,17	3,23	±0,11	3,47	±0,09
Beginn Blüte	2,61	±0,18	2,82	±0,10	2,89	±0,18	2,63	±0,11
Blüte	2,54	±0,14	2,41	±0,05	2,44	±0,07	2,40	±0,11
	Presssaft							
	TSPS [%]							
vor Knospe	5,79	±0,26	6,17	±0,18	6,69	±0,41	5,94	±0,27
Beginn Knospe	5,65	±0,51	5,31	±0,02	5,64	±0,13	6,95	±0,48
Beginn Blüte	6,24	±0,07	6,72	±0,65	5,16	±0,08	5,32	±0,08
Blüte	7,06	±0,11	6,88	±0,05	5,83	±0,07	6,56	±0,10
	Gesamt-N [% der TSPS]							
vor Knospe	2,69	±0,07	2,61	±0,01	1,75	±0,02	1,70	±0,11
Beginn Knospe	2,23	±0,08	2,21	±0,06	1,86	±0,03	1,94	±0,08
Beginn Blüte	1,86	±0,09	1,80	±0,12	1,81	±0,03	2,04	±0,06
Blüte	1,56	±0,05	1,62	±0,06	1,68	±0,04	1,59	±0,01
	α-Amino-N [% der TSPS]							
vor Knospe	1,06	±0,01	1,11	±0,01	0,52	±0,01	0,57	±0,03
Beginn Knospe	0,90	±0,03	0,90	±0,01	0,73	±0,02	0,72	±0,01
Beginn Blüte	0,78	±0,02	0,68	±0,01	0,71	±0,01	0,77	±0,03
Blüte	0,63	±0,02	0,61	±0,01	0,64	±0,01	0,62	±0,00

Tabelle D.10: Abhängigkeit des TS-Gehaltes und des Gehaltes ausgewählter N-Fractionen im Ausgangsmaterial und Presssaft vom Aufwuchs bei verschiedenen Rotkleesorten (n=3)

Rotklee		Ausgangsmaterial für die Presssaftgewinnung		Presssaft (N-Fractionen in % der TSPS)		
Sorte (Ploidie)	Auf- wuchs	TS [%]	Gesamt-N [% d. TS]	TSPS [%]	Gesamt-N	$\alpha$ -Amino-N
Diplomat (2n)	1	18,52 $\pm$ 0,43	2,61 $\pm$ 0,18	6,24 $\pm$ 0,07	1,86 $\pm$ 0,09	0,78 $\pm$ 0,02
	2	16,80 $\pm$ 0,20	3,37 $\pm$ 0,09	5,24 $\pm$ 0,04	1,59 $\pm$ 0,02	0,62 $\pm$ 0,00
Pirat (2n)	1	17,86 $\pm$ 0,09	2,82 $\pm$ 0,10	6,72 $\pm$ 0,65	1,80 $\pm$ 0,12	0,68 $\pm$ 0,01
	2	16,86 $\pm$ 0,21	3,39 $\pm$ 0,07	5,22 $\pm$ 0,03	1,49 $\pm$ 0,02	0,60 $\pm$ 0,00
Harmonie (2n)	1	13,17 $\pm$ 0,19	2,80 $\pm$ 0,06	4,53 $\pm$ 0,06	2,37 $\pm$ 0,02	0,94 $\pm$ 0,01
	2	16,28 $\pm$ 0,51	2,91 $\pm$ 0,09	4,91 $\pm$ 0,10	1,58 $\pm$ 0,08	0,57 $\pm$ 0,00
Melodie (2n)	1	15,41 $\pm$ 0,37	2,61 $\pm$ 0,09	5,28 $\pm$ 0,36	1,87 $\pm$ 0,02	0,79 $\pm$ 0,03
	2	17,32 $\pm$ 0,32	2,79 $\pm$ 0,18	5,41 $\pm$ 0,22	1,63 $\pm$ 0,04	0,62 $\pm$ 0,03
Milvus (2n)	1	16,19 $\pm$ 0,41	2,35 $\pm$ 0,10	5,18 $\pm$ 0,05	2,03 $\pm$ 0,03	0,78 $\pm$ 0,01
	2	19,83 $\pm$ 0,26	2,91 $\pm$ 0,11	5,87 $\pm$ 0,07	1,50 $\pm$ 0,04	0,58 $\pm$ 0,01
Mars (4n)	1	15,94 $\pm$ 0,07	2,89 $\pm$ 0,18	5,16 $\pm$ 0,08	1,81 $\pm$ 0,03	0,71 $\pm$ 0,01
	2	15,84 $\pm$ 0,07	3,79 $\pm$ 0,11	4,86 $\pm$ 0,03	1,61 $\pm$ 0,04	0,61 $\pm$ 0,00
Maro (4n)	1	16,24 $\pm$ 0,43	2,63 $\pm$ 0,11	5,32 $\pm$ 0,08	2,04 $\pm$ 0,06	0,77 $\pm$ 0,03
	2	15,60 $\pm$ 0,21	3,60 $\pm$ 0,04	4,77 $\pm$ 0,03	1,58 $\pm$ 0,08	0,59 $\pm$ 0,01
Greif (4n)	1	14,18 $\pm$ 0,28	2,62 $\pm$ 0,08	4,99 $\pm$ 0,07	2,08 $\pm$ 0,07	0,75 $\pm$ 0,01
	2	15,66 $\pm$ 0,26	2,96 $\pm$ 0,22	5,06 $\pm$ 0,09	1,52 $\pm$ 0,08	0,58 $\pm$ 0,02
Titus (4n)	1	14,24 $\pm$ 0,07	2,54 $\pm$ 0,04	5,00 $\pm$ 0,03	1,97 $\pm$ 0,02	0,73 $\pm$ 0,03
	2	15,65 $\pm$ 0,61	3,03 $\pm$ 0,08	4,91 $\pm$ 0,07	1,58 $\pm$ 0,07	0,60 $\pm$ 0,01
Marathon (4n)	1	13,39 $\pm$ 0,51	2,78 $\pm$ 0,23	4,66 $\pm$ 0,12	2,31 $\pm$ 0,10	0,87 $\pm$ 0,03
	2	15,08 $\pm$ 0,32	2,94 $\pm$ 0,07	5,01 $\pm$ 0,12	1,65 $\pm$ 0,05	0,65 $\pm$ 0,02

Tabelle D.11: Veränderung der Osmolalität während des Anwelkens und im Silierverlauf von Luzerne (Erntetermin 13.05.2004) (n=3)

		<b>Osmolalität [mosmol/kg PS] von Luzerne (0 d) und -silagen (1d bis 96 d)</b>			
ÖT	Beh.	Frisch	Anwelk1	Anwelk2	Anwelk3
0d		389 ± 1	639 ±10	673 ± 1	837 ±10
1d	ohne	434 ± 3	748 ± 7	658 ±129	-
	mit*	654 ± 3	951 ±31	945 ± 84	-
3d	ohne	589 ± 7	961 ±16	1023 ± 60	-
	mit*	809 ± 4	1172 ±21	1213 ± 59	-
6d	ohne	626 ± 4	1045 ±11	1058 ± 19	-
	mit*	865 ±42	1214 ±51	1272 ±176	-
12d	ohne	678 ± 8	1059 ±49	1109 ± 74	-
	mit*	906 ±11	1248 ±32	1246 ±103	-
24d	ohne	667 ±54	1125 ± 7	1118 ±126	-
	mit*	890 ±58	1255 ±84	1309 ±154	-
48d	ohne	753 ± 8	1150 ± 8	1260 ± 29	-
	mit*	948 ± 5	1269 ±66	1491 ±147	-
96d	ohne	810 ± 9	1156 ±11	1340 ± 44	-
	mit*	990 ± 3	1312 ±84	1404 ± 61	-

\* mit Milchsäurebakterien ( $3 \cdot 10^5$  KBE/g FM) und Melasse (4 % der FM)

Tabelle D.12 bis Tabelle D.20:

### **Gärsäuregehalte (% der TS) von Luzernesilagen (Erntetermin 13.05.2004)**

Anmerkung: Die Buttersäuregehalte der Modellsilagen lagen bis auf eine Ausnahme (7. ÖT Anwelk2-Silagen ohne Behandlung: 0,2 % der TS) unter 0,05 % der TS. Daher sind die Gehalte nicht relevant und wurden nicht dargestellt.

Tabelle D.12: Gärprodukte von Luzernefrischsilagen (13,6 % TS) in % der TS zu 7 Öffnungsterminen

Öffnung	Gärprodukte in % der TS				
	Milchsäure	Essigsäure	Propionsäure	Äthanol	Propanol
1. d	1,31	0,65	0	0,33	0,04
3. d	9,51	1,93	0	0,42	0,03
6. d	10,93	2,02	0	0,46	0,02
12. d	11,89	2,51	0	0,40	0,03
24. d	12,77	3,92	0,08	0,76	0,11
48. d	8,09	5,74	0,22	0,95	0,60
96. d	3,46	9,92	0,40	1,54	1,72

Tabelle D.13: Gärprodukte von Luzernefrischsilagen (13,6 % TS) in % der TS mit Melassezusatz (4% der FM) zu 7 Öffnungsterminen

Öffnung	Gärprodukte in % der TS				
	Milchsäure	Essigsäure	Propionsäure	Äthanol	Propanol
1. d	1,29	0,95	0	0,28	0,04
3. d	10,91	2,40	0	0,37	0,0
6. d	11,42	2,32	0	0,33	0,05
12. d	13,16	2,42	0	1,44	0,04
24. d	15,85	3,02	0	1,24	0,05
48. d	14,82	3,55	0,01	1,19	0,33
96. d	16,65	4,66	0,08	1,68	0,89

Tabelle D.14: Gärprodukte von Luzernefrischsilagen (13,6 % TS) in % der TS mit Milchsäurebakterien ( $3 \cdot 10^5$  KBE/g FM) und Melassezusatz (4 % der FM) zu 7 Öffnungsterminen

Öffnung	Gärprodukte in % der TS				
	Milchsäure	Essigsäure	Propionsäure	Äthanol	Propanol
1. d	3,54	1,38	0	0,43	0,03
3. d	12,26	2,10	0	0,35	0,03
6. d	16,19	2,22	0	0,36	0,04
12. d	18,10	2,12	0	1,06	0,04
24. d	18,57	2,25	0	1,02	0,05
48. d	15,38	1,81	0	1,42	0,02
96. d	14,40	2,29	0	1,85	0,04

Tabelle D.15: Gärprodukte von Luzerneanwelk1-Silagen (21,2 % TS) in % der TS zu 7 Öffnungsterminen

Öffnung	Gärprodukte in % der TS				
	Milchsäure	Essigsäure	Propionsäure	Äthanol	Propanol
1. d	1,63	0,77	0	0,30	0,02
3. d	6,14	1,71	0	0,44	0,02
6. d	7,88	1,83	0	0,47	0,02
12. d	9,58	1,88	0	0,35	0,03
24. d	10,20	2,27	0	0,60	0,03
48. d	11,58	2,22	0	0,45	0,03
96. d	11,08	1,95	0	0,53	0,04

Tabelle D.16: Gärprodukte von Luzerneanwelk1-Silagen (21,2 % TS) in % der TS mit Milchsäurebakterien ( $3 \cdot 10^5$  KBE/g FM) und Melassezusatz (4 % der FM) zu 7 Öffnungsterminen

Öffnung	Gärprodukte in % der TS				
	Milchsäure	Essigsäure	Propionsäure	Äthanol	Propanol
1. d	2,05	0,79	0,01	0,30	0,02
3. d	11,93	1,03	0	0,38	0,02
6. d	13,86	1,27	0,01	0,39	0,03
12. d	15,07	1,20	0	0,46	0,02
24. d	14,91	1,17	0	0,42	0,04
48. d	15,66	1,33	0	0,72	0,02
96. d	13,46	1,03	0	0,99	0,03

Tabelle D.17: Gärprodukte von Luzerneanwelk2-Silagen (22,5 % TS) in % der TS zu 7 Öffnungsterminen

Öffnung	Gärprodukte in % der TS				
	Milchsäure	Essigsäure	Propionsäure	Äthanol	Propanol
1. d	5,51	1,60	0	0,70	0,02
3. d	6,05	1,99	0	0,69	0,16
6. d	7,45	1,89	0	0,69	0,02
12. d	8,93	1,98	0,01	0,81	0,02
24. d	10,12	2,57	0,02	0,52	0,04
48. d	11,32	2,82	0	0,76	0,02
96. d	9,28	3,15	0,04	0,73	0,07

Tabelle D.18: Gärprodukte von Luzerneanwelk2-Silagen (22,5 % TS) mit Milchsäurebakterien ( $3 \cdot 10^5$  KBE/g FM) und Melassezusatz (4 % der FM) in % der TS zu 7 Öffnungsterminen

Öffnung	Gärprodukte in % der TS				
	Milchsäure	Essigsäure	Propionsäure	Äthanol	Propanol
1. d	6,05	1,47	0	0,47	0,02
3. d	10,20	1,23	0,01	0,59	0,02
6. d	12,46	1,43	0	0,70	0,03
12. d	12,86	1,54	0	0,61	0,02
24. d	13,87	1,56	0,01	0,80	0,02
48. d	15,12	1,42	0,01	1,85	0,02
96. d	11,66	1,21	0,01	1,78	0,02

Tabelle D.19: Gärprodukte von Luzerneanwelk3-Silagen (27,7 % TS) in % der TS zu 3 Öffnungsterminen

Öffnung	Gärprodukte in % der TS				
	Milchsäure	Essigsäure	Propionsäure	Äthanol	Propanol
24. d	8,30	2,38	0	0,60	0,01
48. d	8,74	2,33	0	0,53	0,02
96. d	7,95	2,18	0,01	0,57	0,03

Tabelle D.20: Gärprodukte von Luzerneanwelk3-Silagen (27,7 % TS) in % der TS mit Milchsäurebakterien ( $3 \cdot 10^5$  KBE/g FM) zu 3 Öffnungsterminen

Öffnung	Gärprodukte in % der TS				
	Milchsäure	Essigsäure	Propionsäure	Äthanol	Propanol
24. d	11,00	1,62	0,01	0,70	0,02
48. d	10,40	1,70	0	0,70	0,04
96. d	9,54	1,46	0	0,64	0,03



Tabelle D.21: Veränderung des freien Aminosäurenstickstoffanteils am Gesamtstickstoff im Presssaft von unterschiedlich angewelkten und behandelten Modellsilagen aus Luzerne während einer Silierdauer von 96 Tagen

Anteil des freien Aminosäurenstickstoffs am Gesamtstickstoff im PS [%] nach															
Silage		1 d		3 d		6 d		12 d		24 d		48 d		96 d	
F*	0	45,4	±0,6	59,3	±1,7	62,8	±4,1	65,4	±0,8	67,2	±1,8	69,2	±1,5	69,7	±2,6
	1	34,8	±0,8	44,2	±2,9	54,0	±1,6	51,7	±0,7	55,3	±2,1	55,3	±2,2	55,0	±2,4
	2	34,5	±0,6	44,8	±1,1	45,7	±1,3	48,7	±0,9	46,4	±3,1	45,6	±4,4	47,0	±3,5
A1	0	41,7	±3,7	47,9	±1,5	52,1	±11,7	54,6	±11,4	61,1	±9,1	59,9	±13,7	66,3	±1,6
	2	26,6	±5,7	37,8	±1,8	41,0	±3,0	44,2	±4,2	48,3	±1,4	50,3	±3,3	50,8	±2,1
A2	0	30,7	±1,2	35,1	±7,8	35,7	±8,5	38,2	±1,2	36,9	±6,1	44,2	±5,7	48,0	±4,7
	2	26,0	±5,9	25,7	±2,0	30,4	±5,1	30,3	±0,9	36,8	±0,6	40,2	±2,5	40,3	±3,4
A3	0	34,9	±6,0	37,0	±2,9	45,7	±4,9	48,1	±0,8	52,9	±1,7	52,4	±3,2	54,5	±4,2
	3	40,4	±1,8	41,6	±1,1	39,8	±3,8	51,0	±2,5	50,0	±0,7	49,0	±2,0	45,5	±3,6

\* F: 14 % TS, A1: 21 % TS, A2 23 % TS, A3: 28 % TS, Behandlung 0: ohne, 1: Melasse, 2: Milchsäurebakterien und Melasse, 3: Milchsäurebakterien

Tabelle D.22: Veränderung des Ammoniakstickstoffanteils am Gesamtstickstoff im Presssaft von unterschiedlich angewelkten und behandelten Modellsilagen aus Luzerne während einer Silierdauer von 96 Tagen (n=3)

Anteil des Ammoniakstickstoffs am Gesamtstickstoff im PS [%] nach															
Silage		1		3		6		12		24		48		96	
F*	0	6,2	±0,3	10,7	±0,4	11,5	±0,1	13,1	±0,4	16,4	±0,5	17,7	±0,3	18,9	±0,5
	1	5,1	±0,1	8,4	±0,6	9,0	±1,0	9,7	±0,1	10,9	±0,5	11,4	±0,6	12,2	±1,1
	2	5,5	±0,1	7,4	±0,1	7,7	±0,2	7,9	±0,1	8,4	±0,2	8,8	±0,1	9,7	±0,2
A1	0	5,3	±0,3	8,6	±0,1	10,1	±0,3	11,3	±0,1	12,5	±0,1	13,4	±0,1	15,1	±0,6
	2	5,1	±0,2	5,2	±0,1	5,8	±0,5	5,7	±0,1	6,1	±0,3	7,5	±0,7	8,1	±0,2
A2	0	4,9	±0,2	6,3	±0,1	7,2	±0,2	7,7	±0,1	8,6	±0,5	9,7	±0,2	11,7	±0,5
	2	3,9	±0,2	4,5	±0,1	4,4	±0,3	4,6	±0,4	5,5	±0,5	5,2	±0,3	6,5	±0,6
A3	0	4,9	±0,1	6,6	±0,1	7,3	±0,2	8,1	±0,2	9,6	±0,2	10,5	±0,3	11,4	±0,4
	3	5,3	±0,3	5,6	±0,4	5,4	±0,2	6,5	±0,8	7,1	±0,8	8,1	±0,4	9,1	±0,1

\* F: 14 % TS, A1: 21 % TS, A2 23 % TS, A3: 28 % TS, Behandlung 0: ohne, 1: Melasse, 2: Milchsäurebakterien und Melasse, 3: Milchsäurebakterien

Tabelle D.23: Reaktionsgeschwindigkeit der Erhöhung des Anteils des freien Aminosäurenstickstoffs am Gesamtstickstoff im Presssaft von unterschiedlich angewelkten und behandelten Modellsilagen aus Luzerne während einer Silierdauer von 96 Tagen

		Reaktionsgeschwindigkeit [%/d] nach						
Silage		1 d	3 d	6 d	12 d	24 d	48 d	96 d
F*	0	50,9	18,8	9,9	5,3	2,8	1,5	0,8
	1	39,8	14,8	7,9	4,2	2,2	1,2	0,6
	2	39,6	14,0	7,2	3,7	1,9	1,0	0,5
A1	0	42,2	16,0	8,6	4,6	2,5	1,3	0,7
	2	30,1	11,9	6,	3,6	1,9	1,1	0,6
A2	0	30,1	11,3	6,0	3,2	1,7	0,9	0,5
	2	23,8	9,3	5,1	2,8	1,5	0,8	0,4
A3	0	35,1	13,4	7,3	3,9	2,1	1,1	0,6
	3	40,6	14,3	7,4	3,8	2,0	1,0	0,5

\* F: 14 % TS, A1: 21 % TS, A2 23 % TS, A3: 28 % TS, Behandlung 0: ohne, 1: Melasse, 2: Milchsäurebakterien und Melasse, 3: Milchsäurebakterien

Tabelle D.24: Reaktionsgeschwindigkeit der Erhöhung des Anteils des Ammoniakstickstoffs am Gesamtstickstoff im Presssaft von unterschiedlich angewelkten und behandelten Modellsilagen aus Luzerne während einer Silierdauer von 96 Tagen

		Reaktionsgeschwindigkeit [%/d] nach						
Silage		1 d	3 d	6 d	12 d	24 d	48 d	96 d
F*	0	6,7	3,3	2,0	1,1	0,6	0,4	0,2
	1	6,1	2,5	1,4	0,8	0,4	0,2	0,1
	2	6,0	2,3	1,2	0,7	0,4	0,2	0,1
A1	0	6,0	2,7	1,6	0,9	0,5	0,3	0,2
	2	4,6	1,8	1,0	0,5	0,3	0,1	0,1
A2	0	4,6	2,1	1,2	0,7	0,4	0,2	0,1
	2	3,7	1,4	0,8	0,4	0,2	0,1	0,1
A3	0	4,9	2,2	1,2	0,7	0,4	0,2	0,1
	3	4,7	1,9	1,0	0,6	0,3	0,2	0,1

\* F: 14 % TS, A1: 21 % TS, A2 23 % TS, A3: 28 % TS, Behandlung 0: ohne, 1: Melasse, 2: Milchsäurebakterien und Melasse, 3: Milchsäurebakterien

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, im August 2008

## Lebenslauf

**Name:** Anja Kofahl, geb. Bickel

**Geburtsdatum:** 15. Januar 1976

**Geburtsort:** Erlangen

**Familienstand:** verheiratet, ein Kind

**Schulbildung:** 1982-1986 Grundschule Moritzbergstraße Nürnberg  
1986-1995 Gymnasium der Wilhelm-Löhe-Schule Nürnberg  
Abschluss: Abitur

**Studium:** 1996-2001 Universität Rostock  
Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät  
Studiengang Agrarökologie  
Abschluss: Diplom-Agraringenieur

**Promotionsstudium:** 2001-2008 Universität Rostock  
Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät  
Institut für Nutztierwissenschaften und Technologie  
Professur für Ernährungsphysiologie und Tierernährung

**Berufstätigkeit:** 2003-2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Projekt „Die Silierung eiweißreicher Grünfütterleguminosen – Untersuchungen zur Proteolyse und deren Beeinflussbarkeit“ finanziert aus den Mitteln des BMELV über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE), Referat 514 – Projektträger Agrarforschung und -entwicklung

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Martin Gabel für die Überlassung des Themas sowie die stets freundliche und zu jeder Zeit gewährte Hilfe und Diskussionsbereitschaft. Des Weiteren danke ich Dr. Klaus Friedel sehr herzlich für wertvolle Anregungen und Diskussionen insbesondere in der Endphase der Arbeit.

Bei Klaus Parr vom Gut Dummerstorf und Wilbert Luesink von der Norddeutschen Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG bedanke ich mich für die Überlassung des Probenmaterials. Der Georg Breuer GmbH danke ich für die Bereitstellung des Testproteinpräparates Pisane.

Allen Mitarbeitern der Professur für Ernährungsphysiologie und Tierernährung möchte ich für die herzliche Aufnahme am Institut danken. Frau Prof. Annette Zeyner danke ich, dass sie mir die Möglichkeit zur Fertigstellung der Promotion an ihrem Lehrstuhl gegeben hat. Für die zahlreichen Analysen bedanke ich mich bei Edda Schröder, Sabine Bremer, Sonja Brüsck, Margitta Beck und Diana Gall. Mein Dank gilt auch den studentischen Hilfskräften Johanna Bröcker, Johannes Klenke, Josefine Flor, Stefanie Busch, Annett Gefrom, Jeannine Lutz, Ann-Marie Müller und Kathrin Kellermann, die stets Einsatzbereitschaft auf dem Feld und im Labor bewiesen haben.

Bei meiner Freundin Sandra Hoedtke bedanke ich mich für die vielen aufmunternden Worte und ihre Gesprächsbereitschaft, die mir bis zuletzt geholfen haben, diese Arbeit fertig zu stellen. Auch die schwierige Aufgabe des Korrekturlesens hat sie zusammen mit Kerrin Schröder übernommen, wofür ich den beiden sehr dankbar bin.

Für die lieben und immer willkommenen aufbauenden Worte danke ich meinen Freundinnen Anne Seehafer, Ute Wend-Ertel und Cathleen Larisch.

Bei meinen Eltern möchte ich mich herzlich bedanken, die immer an mich geglaubt und mir diesen Werdegang ermöglicht haben. Mein Mann, Martin Kofahl, war und ist meine Hauptstütze und hat mich stets ermuntert, immer zu mir gehalten, mir den Rücken freigehalten, mich und meine Launen in schweren Zeiten ertragen und mich in allen Dingen mit all seiner Kraft unterstützt, so dass ich diese Dissertation abschließen konnte. Dafür und für seine Liebe zu mir und unserem Sohn Anton danke ich ihm von Herzen.

Danke für die finanzielle Unterstützung durch die H. Wilhelm Schaumann Stiftung und die Mittel des BMELV über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE), Referat 514 – Projektträger Agrarforschung und –entwicklung, ohne die diese Dissertation nicht entstanden wäre.

**Thesen zur Dissertation:****„Methodische Untersuchungen zur Beurteilung der proteolytischen Aktivität, der Proteolyse und der Desmolyse bei der Silierung eiweißreicher Grünfütterleguminosen“**

vorgelegt von Dipl.-Ing. agr. Anja Kofahl

Der Einsatz von Silagen aus eiweißreichen Grünfütterleguminosen erhält im Hinblick auf die Proteinversorgung der Nutztiere unter dem Aspekt der Nachhaltigkeit eine immer größer werdende Bedeutung. Während der Silierung sind vor allem die Umsetzungen der Stickstoffverbindungen kritisch zu beurteilen, die zu einem Anstieg der NPN-Fractionen führen. Daher sind Kenntnisse über Maßnahmen zur Reduzierung des Proteinabbaus während der Silierung, d.h. ab dem Schnitt des Grüngutes bis zur Entnahme aus dem Silostock, dringend erforderlich. Das Ausmaß des Proteinabbaus wird unabhängig von dem Silierprozess selbst durch die Abbauanfälligkeit des Pflanzenproteins sowie durch die proteolytische Aktivität (pflanzliche und mikrobielle Enzyme) beeinflusst. In der Praxis können beide Faktoren im Vorfeld der Silierung bisher nicht praktikabel bestimmt werden.

Über die Beeinflussbarkeit des Proteinabbaus während der Silierung durch pH-Wert, Anwelken und sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe liegen aus der Literatur allgemeine Kenntnisse vor (CARPINTERO *et al.*, 1979; ALBRECHT und MUCK, 1991; OWENS *et al.*, 2002). Der Silierverlauf, der sich entscheidend auf die Höhe des Proteinabbaus auswirkt, wird durch pflanzenspezifische Faktoren wie Gärsubstratgehalt, Pufferkapazität sowie Epiphytenbesatz bedingt. Die Untersuchung der Wirkungen von Einzelfaktoren und deren Kombinationen (pH-Wert, Osmolalität und sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe) im Hinblick auf den bei der Silierung zu erwartenden Proteinabbau wird bisher nicht unter differenzierten Fermentationsbedingungen durchgeführt.

Die Silagequalität wird mit dem seit 2006 gültigen DLG-Schlüssel zur Beurteilung der Gärqualität von Grünfüttersilagen auf Basis der chemischen Untersuchungen (HERTWIG und BUNDESARBEITSKREIS FUTTERKONSERVIERUNG, 2006) beurteilt. Dabei wird der Ammoniakanteil am Gesamtstickstoff für die Bewertung des Ausmaßes des Proteinabbaus nicht berücksichtigt, da dieses mit dem Buttersäuregehalt hinreichend erfasst werden soll. Diese Aussagen werden angezweifelt. Der Ammoniakgehalt selbst ist ein für den Proteinabbau unzureichendes Bewertungskriterium, denn selbst bei intensiven proteolytischen Prozessen während der Silierung muss der Ammoniakgehalt nicht signifikant ansteigen (MCDONALD *et al.*, 1991).

Es gibt daher einen Bedarf an einfach durchführbaren Labormethoden, die auf die Beurteilung und Erhaltung der Proteinqualität von Silagen ausgerichtet sind und gut reproduzierbare und dabei aussagekräftige Ergebnisse liefern. Mit diesen Methoden soll gleichzeitig die Wirkung von gegenwärtigen und zukünftigen Silierhilfsmitteln auf den Proteinabbau eingeschätzt werden. Ein weiterer Schwerpunkt ist die Festlegung von Parametern, mit denen der Proteinabbau in Silagen bewertet werden kann. Als Beitrag zur Lösung dieser Aufgaben wurden methodische Untersuchungen mit verschiedenen Grünfütterleguminosen (Luzerne, Klee gras, 10 verschiedene Rotklee sorten) durchgeführt, die mit Modellsilagen aus Luzerne und Klee gras in unterschiedlichem Anwelkgrad und teilweise mit verschiedenen Silierzusätzen (Melasse, Milchsäurebakterien und deren Kombination) validiert wurden.

Aus den Ergebnissen der vorgestellten Untersuchungen werden folgende Thesen abgeleitet:

1. Der Presssaft ist ein repräsentatives Substrat der wässrigen Phase von Grünfütterleguminosen und deren Silagen. Seine Zusammensetzung sowie die Veränderungen innerhalb der Stickstofffraktionen spiegeln die des Ausgangsmateriales wider. Die Gewinnung des Presssaftes aus dem Pflanzenmaterial mit einem TS-Gehalt < 40 % erfolgt mit einer Tinkturenpresse mit einem Pressdruck von 100 kp/cm<sup>2</sup>. Bei trockensubstanzreicherem Material wird die Methode der Auszugherstellung nach HOEDTKE (2008) empfohlen, bei der durch eine definierte Wasserzugabe der TS-Gehalt auf 20 % eingestellt wird. Die nach Abpressung erhaltenen Auszüge sind alternativ zum Presssaft zu verwenden, wobei eine Umrechnung der Ergebnisse auf die Originaltrockensubstanz erfolgen muss.

2. Die proteolytische Aktivität kann im Presssaft von Grünfütterleguminosen und deren Silagen mit der konzipierten in-vitro Methode einfach und reproduzierbar bestimmt werden. Sie gibt die Wirkung der proteolytischen Enzyme der wässrigen Phase (pflanzlich und mikrobiell) auf ein pflanzliches Testproteinpräparat (Pisane, Firma Breuer GmbH) bei der Berücksichtigung der Eigenproteolyse des Presssaftes und der Eigenproteolyse des Testproteinpräparates an. Die Berechnung erfolgt mittels der nach ROSEN (1957) quantifizierten  $\alpha$ -Amino-N-Gehalte der verschiedenen Inkubationsmedien:

$$PA = PL_{ges} - PL_{eigenPS} - PL_{eigenTPL} \text{ [mg freigesetzter } \alpha\text{-Amino-N aus der TPL/ml Presssaft]}$$

Durch den Bezug dieser Werte auf den im Presssaft enthaltenen Gesamt-N-Gehalt entsteht die zwischen unterschiedlichen Presssäften vergleichbare Einheit für die proteolytische Aktivität in mg freigesetzter  $\alpha$ -Amino-N aus der TPL/g Gesamt-N im PS.

3. Zur Einschätzung des zu erwartenden Proteinabbaus und der Siliereignung des Pflanzenmaterials können im Presssaft weitere Parameter vor der Silierung bestimmt werden. Der Parameter für die Abbauanfälligkeit des Pflanzenproteins während der Silierung ist der Gesamtstickstoffgehalt des Presssaftes in Relation zum Gesamtstickstoffgehalt des Pflanzenmaterials. Zur weiteren Beurteilung der Zusammensetzung der Stickstofffraktionen vor Silierbeginn können im Presssaft der  $\alpha$ -Amino-Stickstoff und der Ammoniakstickstoff analysiert werden, woraus sich der freie Aminosäurenstickstoff berechnen lässt. Die Osmolalität des Presssaftes ist eine wichtige Größe, um die selektiv hemmende Wirkung auf Gärschädlinge festzustellen.
4. Durch die Modifikation des Rostocker Fermentationstests kann vor Silierbeginn neben der Beurteilung der Vergärbarkeit des Pflanzenmaterials auch die Wirksamkeit verschiedener Einflussfaktoren (Silierzusätze, Anwelken, sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe) hinsichtlich der Reduzierung des zu erwartenden Proteinabbaus während der Silierung mit der Analyse des  $\alpha$ -Amino-N-Gehaltes der Extrakte nach Inkubationsende untersucht werden. Damit können die zu einem minimierten Proteinabbau führenden Silierbedingungen (geeignete Silierzusätze, Anwelkgrad) erkannt werden.
5. Als Parameter zur Quantifizierung und Beurteilung der Prozesse Proteolyse und Desmolyse in Silagen dienen die Gehalte von freiem Aminosäurenstickstoff resp. Ammoniakstickstoff im Presssaft. Durch den Bezug auf den Gesamtstickstoffgehalt des Presssaftes werden die Ergebnisse von unterschiedlichen Silagen vergleichbar. Aufgrund der Korrelation des Anteils des freien Aminosäurenstickstoffs am Gesamtstickstoff im Presssaft ( $y$  in mg freier AS-N im PS/100 mg Gesamt-N im PS) und des Anteils des Reinproteinstickstoffs am Gesamtstickstoff der Silage ( $x$  in mg Reinprotein-N der Silage/100 mg Gesamt-N der Silage), kann auf die aufwändige und oft ungenaue Reinproteinbestimmung verzichtet werden:  
$$y = 68,6 - 0,5 \cdot x \quad R^2=0,64 \quad s\pm 6,19 \quad p<0,001 \quad (n=82)$$
  
Bei einem niedrigen Reinproteinanteil am Gesamtstickstoff der Silage ist der Anteil der freien Aminosäuren am Gesamtstickstoff im Presssaft hoch.
6. Der Presssaft aus Silagen ist ein universell einsetzbares Untersuchungsmedium, in dem schnell und einfach weitere wichtige Parameter (z.B. Osmolalität, pH-Wert, Gärsäuren) zur Qualitätsbeurteilung der Silagen erfasst werden können.



7. Ein schneller und tiefer pH-Wert-Abfall ist die wirkungsvollste Möglichkeit, den Proteinabbau zu minimieren. Dadurch werden sowohl die Aktivität pflanzlicher Enzyme reduziert als auch säureintolerante, desmolytisch wirkende Gärschädlinge (Clostridien und Enterobakterien) inhibiert. Geeignete Silierzusätze können den Silierverlauf dementsprechend optimieren. Dabei treten gegebenenfalls zugesetzte Milchsäurebakterien in Konkurrenz mit den Gärschädlingen und helfen, diese zu unterdrücken. Ist der Zusatz von Melasse bei gärsubstratarmen Pflanzenmaterialien vorgesehen, wird in Verbindung mit leistungsstarken Milchsäurebakterien der Silierverlauf ebenfalls verbessert.
8. Die proteolytische Aktivität des Siliergutes verringert sich mit zunehmendem Anwelkgrad. Durch die Erhöhung der Osmolalität, z.B. durch das Anwelken des Siliergutes oder den Zusatz von Melasse, wird auch der Proteinabbau während der Silierung reduziert. Die Osmolalitätserhöhung der wässrigen Phase führt zu einer Reduzierung der Aktivität proteolytischer Enzyme. Zum anderen werden osmointolerante Gärschädlinge inhibiert, wodurch auch desmolytische Prozesse verhindert werden. Jedoch ist der reduzierende Einfluss der Osmolalität geringer als der des pH-Wertes. Eine zu hohe Osmolalität hemmt auch die Milchsäurebakterien. Der dadurch verspätete Fermentationsbeginn zeigt sich in einem langsamen pH-Wert-Abfall, in Folge dessen der Proteinabbau vor allem zu Beginn der Silierung groß sein kann.
9. Eine hohe proteolytische Aktivität ( $x$  in mg freigesetzter  $\alpha$ -Amino-N aus der TPL/g Gesamt-N im PS) führt zu einem starken Anstieg des Anteils des freien Aminosäurenstickstoffs am Gesamtstickstoff im Presssaft ( $y$  in %) während der Silierung:  
$$y = 0,41 \cdot x \quad R^2=0,67 \quad s\pm 2,79 \quad p<0,001 \quad (n=36)$$
  
Der größte Anstieg der Anteile des freien Aminosäurenstickstoffs am Gesamtstickstoff im Presssaft erfolgt in den ersten drei Tagen der Silierung. Danach ist der Anstieg degressiv.
10. Der Anstieg des Anteils des Ammoniakstickstoffs am Gesamtstickstoff im Presssaft ist im Vergleich zu dem des freien Aminosäurenstickstoffanteils langsamer. Dieser Prozess läuft jedoch bis zum Ende der Silierdauer (96 Tage) permanent weiter, wodurch von einem hohen Ammoniakgehalt vor allem bei lang gelagerten unbehandelten Silagen ausgegangen werden muss.
11. Der zu erwartende Proteinabbau wird vom Silierverlauf, von der proteolytischen Aktivität und der Abbauanfälligkeit des Pflanzenproteins beeinflusst. Im Vergleich zu Luzerne

weist Klee gras trotz eines höheren Rohproteingehaltes sowohl eine geringere proteolytische Aktivität als auch eine niedrigere Abbauanfälligkeit des Pflanzenproteins auf. Die Silagen mit vergleichbaren Behandlungen unterscheiden sich derart, dass die Klee grassilagen einen geringeren Proteinabbau aufweisen. Die Abbauanfälligkeit des Pflanzenproteins wird vor allem durch sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe wie Tannine und PPO beeinflusst. Die proteinschützende Wirkung der Tannine zeigt sich im modifizierten Rostocker Fermentationstest. In unbehandelten Mischsilagen aus Luzerne mit Hornklee (Wirkung der Tannine) resp. mit Rotklee (Wirkung der PPO) ist der Proteinabbau im Vergleich zu reinen Luzernesilagen reduziert. Dabei werden die Effekte durch einen mit geeigneten Silierzusätzen optimierten Silierverlauf überlagert.

12. Die in-vitro Methode zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität und der modifizierte Rostocker Fermentationstest sind geeignet, um vor der Silierung die Beeinflussbarkeit des Proteinabbaus zu untersuchen. Es können aussagefähige Einschätzungen über das zu erwartende Ausmaß des Proteinabbaus während der Silierung getroffen werden. Die Aussagen dieser Methoden stimmen mit Literaturergebnissen und mit den eigenen Ergebnissen der zur Validierung genutzten Modellsilagen überein.
13. Tetraploide Rotklee sorten weisen im Vergleich zu diploiden Sorten eine signifikant geringere proteolytische Aktivität in Verbindung mit einer tendenziell niedrigeren Abbauanfälligkeit des Proteins auf. Erwartet wird daher, dass der Proteinabbau in Silagen aus tetraploiden Rotklee sorten niedriger ist als in Silagen aus diploiden Sorten. Im Vegetationsverlauf aller Rotklee sorten nimmt die proteolytische Aktivität zu, während der potentiell abbaubare Gesamtstickstoff im Presssaft abnimmt. Die Beeinflussung des Ausmaßes des Proteinabbaus während der Silierung durch die Wahl des Erntetermins stellt daher eine weitere noch zu überprüfende Hypothese dar.